หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการทดลอง

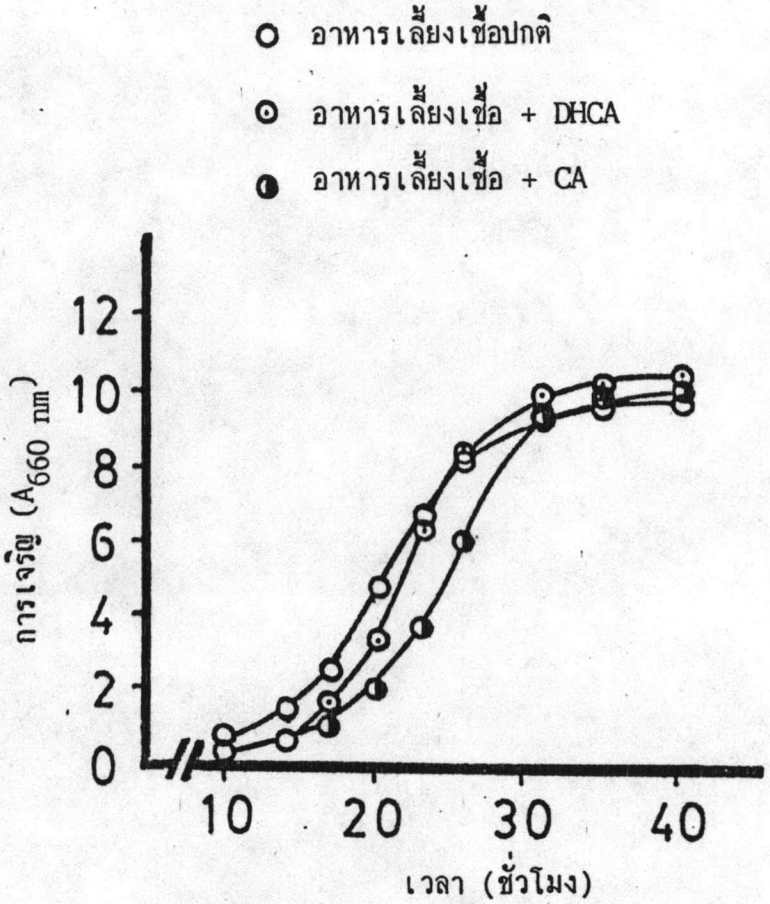
4.1 ผลการศึกษาธรรมชาติของการผลิตเอนไซม์ α-HSDH ใน B. fuscum โดยการเหนี่ยวนำด้วยกรดดีไฮโดรโคลิกและกรดโคลิก

4.1.1 การเหนี่ยวนำตั้งแต่เริ่มต้นเลี้ยงเชื้อ

เพาะเลี้ยง B. fuscum ในอาหารเลี้ยงเชื้อปกติ (ข้อ 3.1) และอาหารชนิดเดียวกันที่เสริมด้วยกรดดีไฮโดรโคลิกหรือกรดโคลิก (0.1 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 200 มิลลิลิตร) ติดตามการเจริญ (ข้อ 3.4) พร้อมทั้งวัดปริมาณโปรตีน (วิธีข้อ 3.7) และแอคติวิตีของเอนไซม์ 3α-, 7α- และ 12α-HSDH โดยใช้กรดโคลิก, กรดดีออกซีโคลิก, กรดดีโนดีออกซีโคลิก และกรดลิโทโคลิกเป็นสับสเตรต (วิธีข้อ 3.6.1)

ผลการศึกษาเปรียบเทียบลักษณะการเจริญ (รูปที่ 6) จะเห็นว่าการเสริมกรดดีไฮโดรโคลิกหรือกรดโคลิกตั้งแต่เริ่มต้นเลี้ยงเชื้อจะมีผลทำให้อัตราการเจริญของ B. fuscum ช้าลงเมื่อเทียบกับการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้เสริมด้วยกรดน้ำดีใด ๆ และการเพาะเลี้ยง B. fuscum ในอาหารที่เสริมด้วยกรดโคลิกจะทำให้อัตราการเจริญช้าลงมากกว่าในอาหารที่เสริมด้วยกรดดีไฮโดรโคลิก อย่างไรก็ตาม กรดน้ำดีทั้ง 2 ชนิด (กรดดีไฮโดรโคลิกและกรดโคลิก) ไม่มีผลต่อค่าการเจริญสูงสุดและระยะเวลาการเพาะเลี้ยงของ B. fuscum ที่ให้ค่าการเจริญสูงสุด (stationary phase) จากผลการทดลองพบว่าเชื้อยังสามารถเข้าสู่ระยะการเจริญสูงสุดได้ภายในเวลาประมาณ 40 ชั่วโมง และด้วยค่าความขุ่นประมาณ 10 เช่นเดียวกับเชื้อที่เจริญในอาหารปกติ

รูปแบบการผลิตเอนไซม์ α-HSDH ของ B. fuscum ซึ่งแสดงโดยแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ เมื่อวัดโดยใช้กรดโคลิก, กรดดีออกซีโคลิก, กรดดีโนดีออกซีโคลิก, และกรดลิโทโคลิกเป็นสับสเตรต แสดงให้เห็นว่า B. fuscum ที่เจริญในอาหารปกติ (รูปที่ 7 ก) จะสามารถผลิตเอนไซม์ α-HSDH ทั้ง 3 ชนิดได้สูงสุดที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 23 ชั่วโมง (ค่าความขุ่น 6-7) ซึ่งตรงกับระยะปลายของการเจริญแบบทวีคูณ (late log phase)



รูปที่ 6 ลักษณะการเจริญของ B. fuscum ในอาหารเลี้ยงเชื้อปกติ, อาหารที่เสริมด้วยกรดดีไฮโดรโคลิก และอาหารที่เสริมด้วยกรดโคลิก (0.1 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 200 มล.) ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ กัน ณ อุณหภูมิ 30 °ซ (วิธีทดลองข้อ 3.3.2.2)

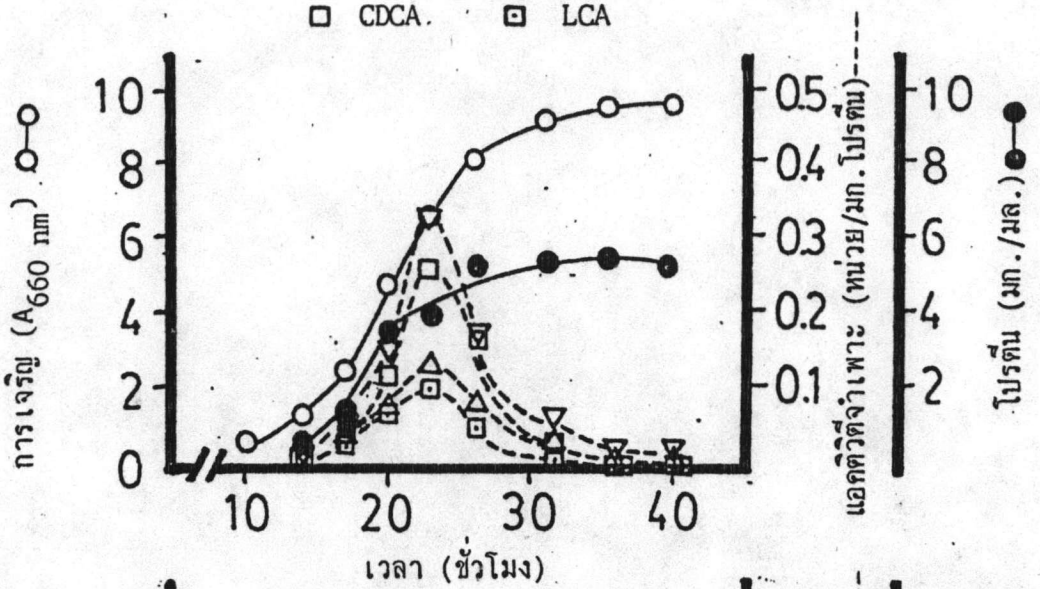
โดยวัดแอคติวิตีจำเพาะ (specific activity) สูงสุดเมื่อใช้กรดโคลิก และกรดดีโนดีออก-ซีโคลิกเป็นสับสเตรตได้ 0.33 และ 0.26 หน่วย/มก.โปรตีน ตามลำดับ ในขณะที่วัดแอคติวิตีจำเพาะสูงสุดเมื่อใช้กรดดีออกซีโคลิก และกรดลิโทโคลิกเป็นสับสเตรตได้เพียง 0.13 และ 0.10 หน่วย/มก.โปรตีน ตามลำดับ ซึ่งแสดงว่า B. fuscum ที่เจริญในอาหารปกติและไม่ถูกเหนี่ยวนำน่าจะมีการสังเคราะห์เอนไซม์ 7α-HSDH ได้สูงกว่าเอนไซม์ 12α-HSDH และ 3α-HSDH ประมาณ 2 เท่า สำหรับความเข้มข้นของโปรตีนที่วัดได้ในช่วงต่าง ๆ ของการเจริญจะแปรผันตามค่าการเจริญจนกระทั่ง B. fuscum เจริญเข้าระยะการเจริญกึ่งทวีคูณ (mid log phase) (ค่าความขุ่นของเซลล์ประมาณ 4). การสังเคราะห์โปรตีนจึงเริ่มช้าลง

เมื่อทดลองเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์ α-HSDH โดยการเสริมด้วยกรดดีไฮ-โดรโคลิก หรือกรดโคลิกในอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งแต่เริ่มต้นเลี้ยงเชื้อ จะให้ผลการเหนี่ยวนำที่คล้ายคลึงกัน (รูปที่ 7 ข และ 7 ค) คือสามารถทำให้ B. fuscum ผลิตเอนไซม์ α-HSDH ถึงจุดสูงสุดได้เร็วขึ้นในระยะต้นของการเจริญแบบทวีคูณ (early log phase) (เวลา 14 และ 17 ชั่วโมง สำหรับการเหนี่ยวนำโดยกรดดีไฮโดรโคลิกและกรดโคลิกตามลำดับ, ค่าความขุ่นประมาณ 1-2) และที่สำคัญก็คือวัดแอคติวิตีจำเพาะสูงสุดเมื่อใช้กรดดีออกซีโคลิกเป็นสับสเตรตได้สูงถึง 0.58 และ 0.54 หน่วย/มก. โปรตีน สำหรับการเหนี่ยวนำด้วยกรดดีไฮโดรโคลิกและกรดโคลิก ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกับแอคติวิตีจำเพาะสูงสุดเมื่อวัดโดยใช้กรดโคลิกเป็นสับสเตรต(0.57 และ 0.56 หน่วย/มก.โปรตีน สำหรับการเหนี่ยวนำด้วยกรดดีไฮ-โดรโคลิกและกรดโคลิก ตามลำดับ) ซึ่งค่าที่วัดได้เหล่านี้มีค่าสูงกว่าแอคติวิตีสูงสุดเมื่อวัดโดยใช้กรดดีโนดีออกซีโคลิก และกรดลิโทโคลิกอย่างเห็นได้ชัด (0.06 หน่วย/มก.โปรตีน เมื่อวัดโดยใช้กรดดีโนดีออกซีโคลิกเป็นสับสเตรตทั้งการเหนี่ยวนำโดยกรดดีไฮโดรโคลิกและกรดโคลิก และ 0.05 และ 0.04 หน่วย/มก.โปรตีน เมื่อใช้กรดลิโทโคลิกเป็นสับสเตรตสำหรับการเหนี่ยวนำด้วยกรดดีไฮโดรโคลิกและกรดโคลิก) แสดงว่า B. fuscum ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยกรดดีไฮโดรโคลิกหรือกรดโคลิกตั้งแต่เริ่มต้นเลี้ยงเชื้อน่าจะสังเคราะห์เอนไซม์ 12α-HSDH ได้สูงกว่าเอนไซม์ 7α-HSDH ประมาณ 9 เท่า และสูงกว่าเอนไซม์ 3α-HSDH ประมาณ 11-13 เท่า และแอคติวิตีของเอนไซม์ 12α-HSDH ที่ถูกเหนี่ยวนำจะมีค่าสูงกว่าแอคติวิตีจำเพาะสูงสุดเมื่อไม่มีการเหนี่ยวนำมากกว่า 4 เท่า นอกจากนี้ผลการทดลองยังแสดงให้เห็นอีกว่าการเสริมกรดดีไฮโดรโคลิกหรือกรดโคลิกตั้งแต่เริ่มต้นเลี้ยงเชื้อไม่น่าจะมีผลกระทบต่อรูปแบบและค่าความเข้มข้นของโปรตีนที่วัดได้ในแต่ละช่วงของการเจริญแต่อย่างใด

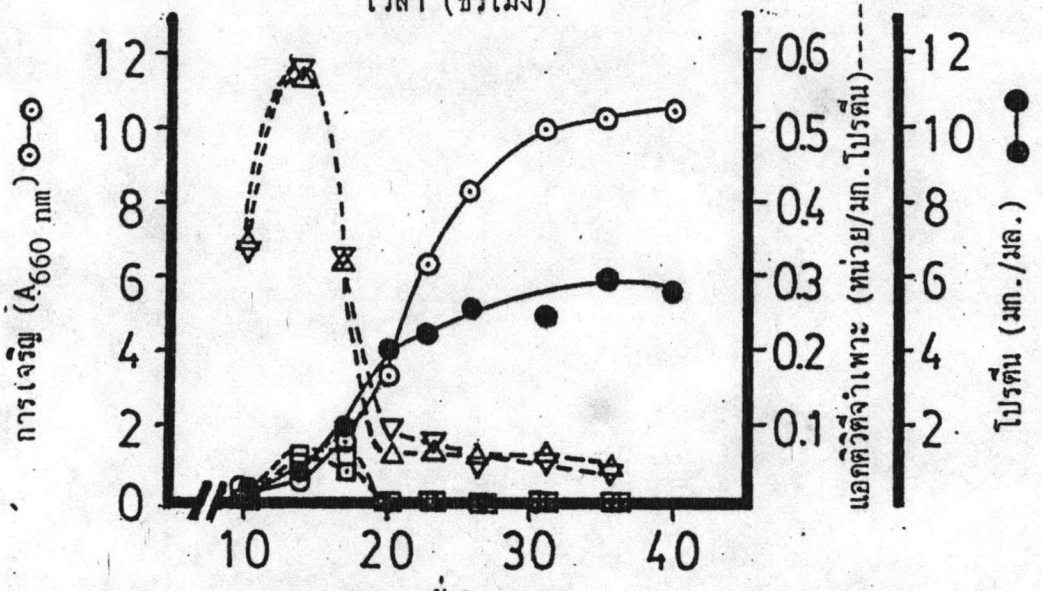
รูปที่ 7 ลักษณะการเจริญ, ความเข้มข้นของโปรตีน และรูปแบบการผลิตเอนไซม์ α-HSDH ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ ของ B. fuscum ซึ่งเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อปกติ (ก), อาหารเลี้ยงเชื้อที่เสริมด้วยกรดคีไฮโดรโคลิก (ข), และอาหารเลี้ยงเชื้อที่เสริมด้วยกรดโคลิก (ค) (วิธีทดลองข้อ 3.8.1)

I17503346

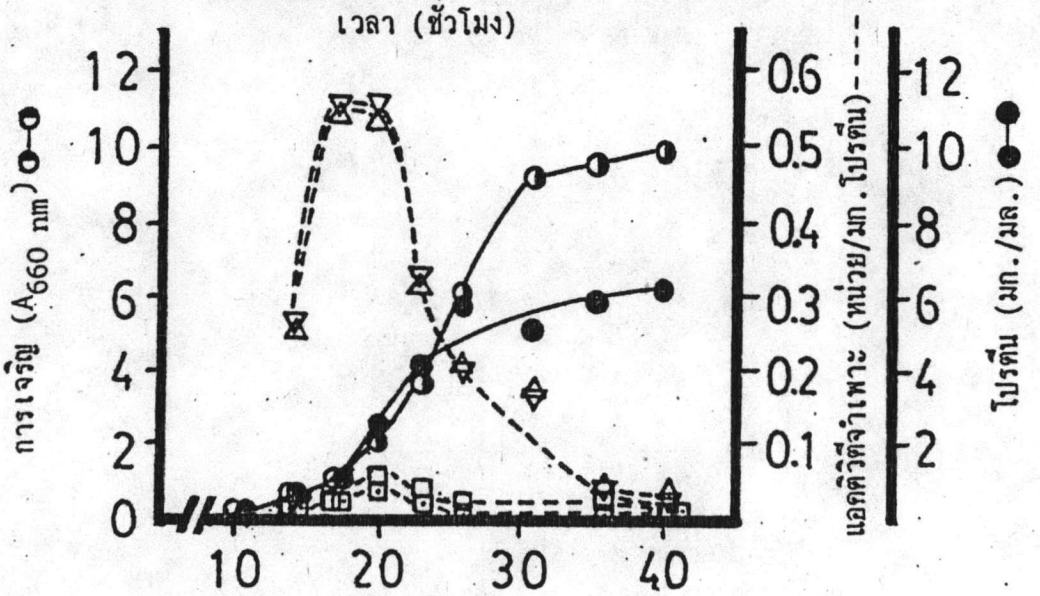
สับสเตรต : ▽ CA △ DCA □ CDCA ⊡ LCA



รูป 7 ก.



รูป 7 ข.



รูป 7 ค.

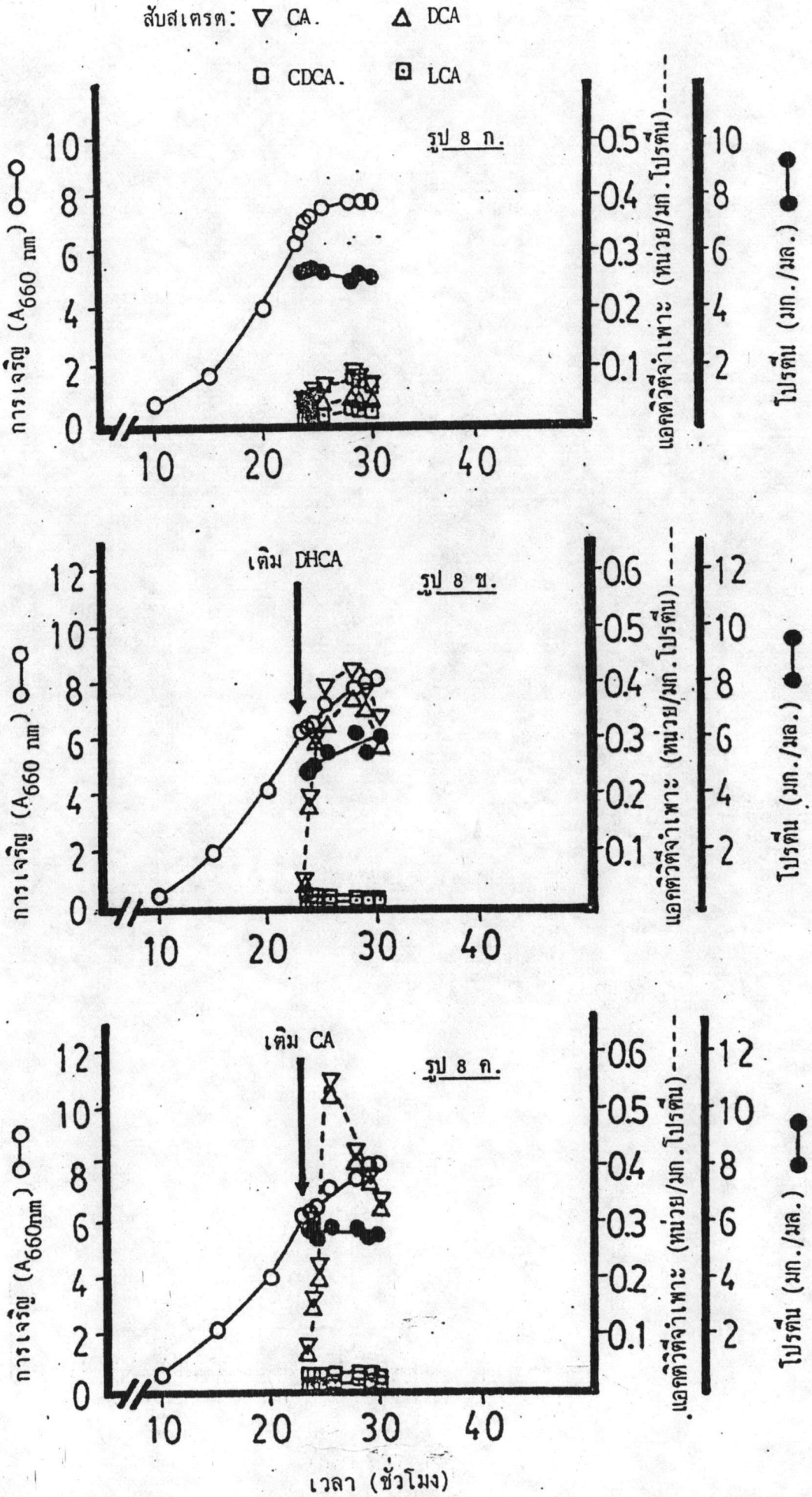
4.1.2 การเหนี่ยวนำเฉพาะที่

จากผลการทดลองข้อ 4.1.1 ที่พบว่าการผลิตเอนไซม์ α-HSDH โดย B. fuscum ที่เจริญในอาหารปกติ (รูปที่ 7) จะมีช่วงเวลาสูงสุดของการผลิตที่เวลาประมาณ 23 ชั่วโมง (ค่าความขุ่นประมาณ 6-7) ซึ่งใกล้เคียงกับระยะการเจริญช่วงปลายทวีคูณ) ดังนั้นจึงได้ทำการทดลองเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์ α-HSDH ที่ระยะนี้โดยเพาะเลี้ยง B. fuscum ในอาหารเลี้ยงเชื้อปกติเป็นระยะเวลา 23 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงเติมกรดดีไฮโดรโคลิกหรือกรดโคลิก (0.1 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 200 มิลลิลิตร) (วิธีข้อ 3.8.2) พร้อมทั้งติดตามการเจริญโดยการวัดค่าความขุ่น (วิธีข้อ 3.4) วัดปริมาณโปรตีน (วิธีข้อ 3.7) และแอคติวิตีของเอนไซม์เมื่อใช้กรดโคลิก, กรดดีออกซีโคลิก, กรดดีโนดีออกซีโคลิก และกรดลิโทโคลิกเป็นสับสเตรต (วิธีข้อ 3.6.1)

ในการศึกษาการเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์กลุ่ม α-HSDH โดยกรดดีไฮโดร-โคลิก หรือกรดโคลิก หลังจากที่เจริญ B. fuscum ไปเป็นเวลา 23 ชั่วโมง ได้กระทำควบคู่ไปกับ control คือเชื้อที่ไม่ถูกเหนี่ยวนำ ผลการวิจัย (รูปที่ 8) พบว่าเมื่อไม่มีการเหนี่ยวนำ B. fuscum จะสามารถผลิตเอนไซม์ α-HSDH ได้ในระดับต่ำ คือมีแอคติวิตีจำเพาะสูงสุดเมื่อวัดโดยใช้กรดโคลิกและกรดดีโนดีออกซีโคลิกเพียง 0.1 หน่วย/มก.โปรตีน ในขณะที่ค่าซึ่งวัดโดยใช้กรดดีออกซีโคลิกและกรดลิโทโคลิกเป็นสับสเตรตมีค่าเพียง 0.05 และ 0.04 หน่วย/มก.โปรตีน ตามลำดับ แสดงว่า B. fuscum ที่เจริญโดยไม่มีการเหนี่ยวนำ หลังจากเจริญไปแล้ว 23 ชั่วโมง น่าจะมีการผลิตเอนไซม์ α-HSDH ต่ำกว่าที่เวลา 23 ชั่วโมง (ข้อ 4.1.1) แต่อย่างไรก็ตาม ตัวเลขจากผลการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ก็ยังพอจะยืนยันได้ว่า B. fuscum มีการผลิตเอนไซม์ α-HSDH ได้ครบทั้ง 3 ชนิด โดยสามารถผลิตเอนไซม์ 7α-HSDH ได้สูงกว่าเอนไซม์ 12α-HSDH และ 3α-HSDH เช่นเดียวกับผลการทดลองในข้อ 4.1.1

การเสริมกรดดีไฮโดรโคลิกหรือกรดโคลิกหลังจากที่เจริญ B. fuscum ไปเป็นเวลา 23 ชั่วโมง จะสามารถเหนี่ยวนำแอคติวิตีของเอนไซม์เมื่อวัดโดยใช้กรดโคลิกและกรดดีออกซีโคลิกเป็นสับสเตรตให้ถึงจุดสูงสุดได้ภายในระยะเวลา 2.5-3 ชั่วโมง หลังจากที่เติมสับสเตรตที่เป็นอนุพันธ์กรดโคลิกลงไปโดยไม่มีผลต่อรูปแบบการเจริญ ตลอดจนปริมาณโปรตีนที่วัดได้ (รูปที่ 8) และการเหนี่ยวนำด้วยวิธีนี้จะให้ค่าแอคติวิตีจำเพาะสูงสุดของเอนไซม์เมื่อวัดโดยสับสเตรตทั้ง 4 ชนิด ใกล้เคียงกับการเหนี่ยวนำด้วยการเติมสารอนุพันธ์กรดโคลิกที่ใช้เป็นสับสเตรต

รูปที่ 8 ลักษณะการเจริญ, ความเข้มข้นของโปรตีน และรูปแบบการผลิตเอนไซม์ α-HSDH ที่เวลาต่าง ๆ หลังจากที่เจริญ B. fuscum ไปเป็นระยะเวลา 23 ชั่วโมง แล้วเหนี่ยวนำโดยการเสริมกรดดีไฮโดรโคลิก (รูป ข) หรือกรดโคลิก (รูป ก) 0.1 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 200 มิลลิลิตร ลงในเชื้อที่กำลังเจริญนั้น เปรียบเทียบกับเมื่อไม่มีการเหนี่ยวนำในสภาวะการทดลองเดียวกัน (รูป ก) (วิธีทดลองข้อ 3.8.2)


สับสเตรต: ▽ CA. △ DCA
□ CDCA. ⊡ LCA
รูป 8 ก.
การเจริญ ($A_{660\ nm}$)
แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.โปรตีน)
โปรตีน (มก./มล.)
เติม DHCA
รูป 8 ข.
เติม CA
รูป 8 ค.
เวลา (ชั่วโมง)

ตั้งแต่เริ่มต้นเลี้ยงเชื้อ คือวัดแอคติวิตีสูงสุดเมื่อใช้กรดดีออกซีโคลิกเป็นสับสเตรต (0.42 และ 0.52 หน่วย/มก.โปรตีน สำหรับการเหนี่ยวนำโดยกรดดีไฮโดรโคลิกและกรดโคลิก) ได้ใกล้เคียงกับเมื่อใช้กรดโคลิกเป็นสับสเตรต (0.41 และ 0.54 หน่วย/มก.โปรตีน) และมีค่าสูงกว่าแอคติวิตีจำเพาะสูงสุดของกรดดีโนดีออกซีโคลิกและกรดลิโทโคลิก (0.06 และ 0.03 หน่วย/มก.โปรตีน ทั้งการเหนี่ยวนำโดยกรดดีไฮโดรโคลิกและกรดโคลิก) ดังนั้นการเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์ α-HSDH ทั้ง 3 ชนิด ใน B. fuscum ไม่ว่าจะโดยกรดดีไฮโดรโคลิกหรือกรดโคลิก และไม่ว่าจะเป็นการเหนี่ยวนำตั้งแต่เริ่มต้นเลี้ยงเชื้อ (ข้อ 4.1.1) หรือเหนี่ยวนำเฉพาะที่หลังจากที่เจริญ B. fuscum ไปเป็นเวลา 23 ชั่วโมง เกิดได้ในระดับใกล้เคียงกัน (จะสามารถเหนี่ยวนำแอคติวิตีของเอนไซม์ 12α-HSDH ได้ดีใกล้เคียงกัน และไม่น่ามีผลเหนี่ยวนำต่อการสังเคราะห์เอนไซม์ 7α-HSDH และ 3α-HSDH เช่นเดียวกัน)

4.2 ผลการศึกษาวิธีเตรียมเชื้อ B. fuscum ปริมาณมาก

ใช้วิธีการเหนี่ยวนำเฉพาะที่ (ข้อ 4.1.2) สำหรับเตรียมเชื้อ B. fuscum ปริมาณมาก เพื่อใช้เป็นแหล่งของเอนไซม์ 12α-HSDH ที่จะนำไปศึกษาและทำให้บริสุทธิ์ วิธีเตรียมทำได้โดยเพาะเลี้ยง B. fuscum ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (วิธีข้อ 3.3.2.2) ไปเป็นเวลา 23 ชั่วโมง ($OD_{660\ nm}$ ประมาณ 6-7) แล้วเติมโซเดียมโคเลท (0.1 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 200 มิลลิลิตร) ลงไปในเชื้อที่กำลังเจริญนั้น ทำการเขย่าต่ออีก 3 ชั่วโมง จึงเก็บเชื้อมาปั่นและล้างด้วยโปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ซึ่งในสภาวะการเพาะเลี้ยงที่กล่าวมานี้พบว่าเชื้อปริมาณ 1 ลิตร จะได้น้ำหนักของเซลล์เปียกประมาณ 10 กรัม จากนั้นเก็บเซลล์ที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -70 °ซ

4.3 ผลการศึกษาหาความเข้มข้นของเซลล์ที่เหมาะสมต่อผลผลิตและแอคติวิตีของเอนไซม์ α-HSDH ปริมาณมาก

เตรียมสารละลายเอนไซม์ที่ความเข้มข้นของเซลล์ต่าง ๆ กัน โดยแปรผันอัตราส่วนระหว่างจำนวนกรัมของเซลล์เปียกต่อมิลลิลิตรของบัฟเฟอร์ที่ใช้กระจายเซลล์เป็น 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 และ 1:6 เมื่อเตรียมสารละลายเอนไซม์ (ข้อ 3.5.2) ได้แล้วนำไปวัดปริมาณโปรตีน (ข้อ 3.7) และวัดแอคติวิตีของเอนไซม์โดยใช้กรดดีออกซีโคลิก, กรดดีโนดีออกซีโคลิก และกรดลิโทโคลิกเป็นสับสเตรต (ข้อ 3.6.1)

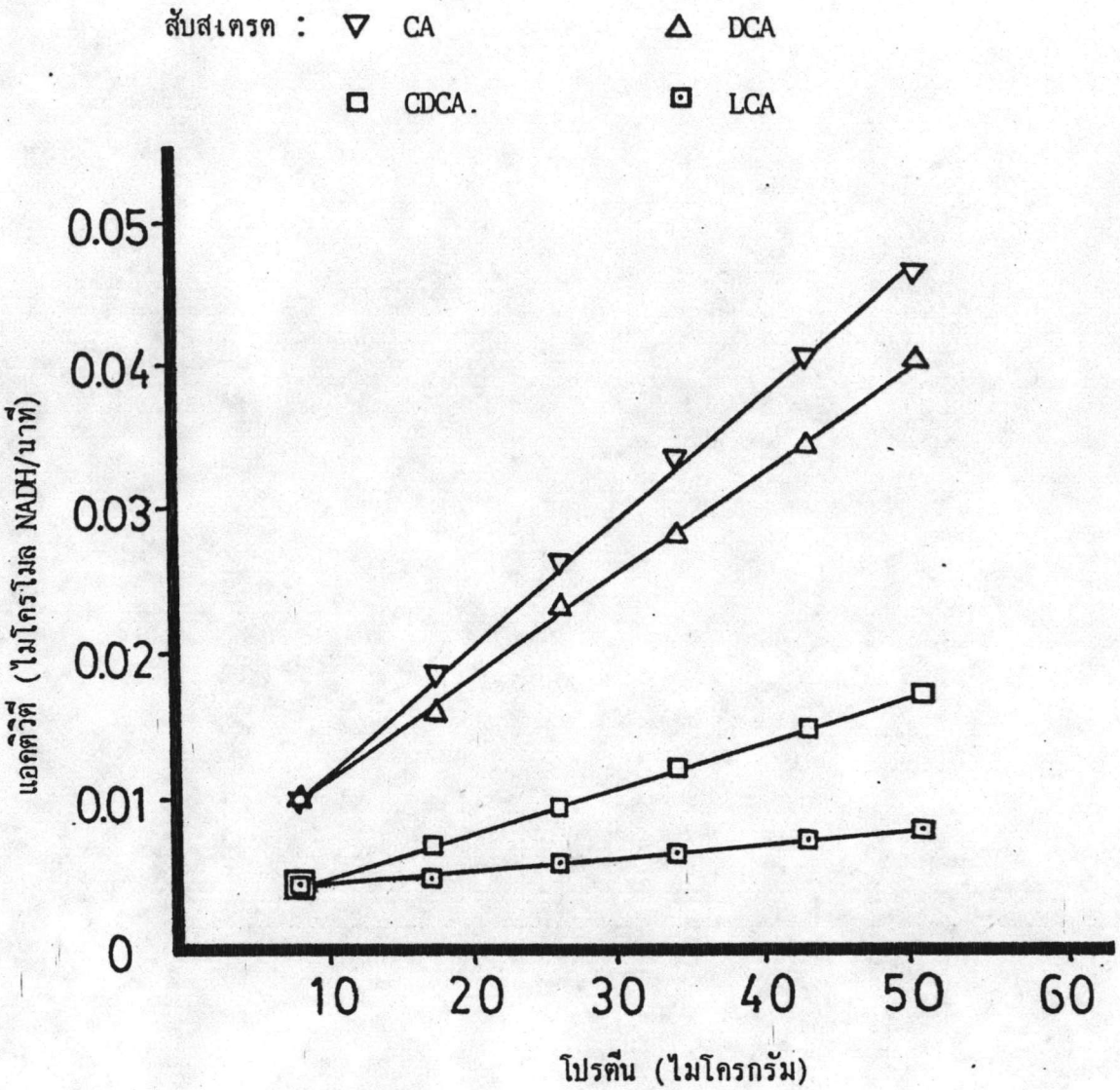
ตารางที่ 2 แสดงผลกระทบของความเข้มข้นของเซลล์ที่ใช้เตรียมสารละลายเอนไซม์ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ α-HSDH ซึ่งจะเห็นได้ว่าความเข้มข้นของเซลล์ที่แตกต่างกันจะให้ค่าแอคติวิตีจำเพาะเมื่อวัดโดยใช้กรดคีออกซีโคลิก, กรดคีโนคีออกซีโคลิก และกรดลิโทโคลิกเป็นสับสเตรตใกล้เคียงกัน แต่จะให้ความเข้มข้นของโปรตีนและโดยเฉพาะแอคติวิตีต่อจำนวนกรัมของเซลล์เปียก (หน่วย/กรัมของเซลล์เปียก) แตกต่างกัน และเมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นเซลล์อื่น ๆ ความเข้มข้นของเซลล์ที่มีอัตราส่วนระหว่างจำนวนกรัมเซลล์ต่อมิลลิลิตรของบัฟเฟอร์ที่ใช้กระจายเซลล์เป็น 1:3 จะให้ค่าความเข้มข้นของโปรตีนที่วัดได้รวมทั้งค่าแอคติวิตีต่อจำนวนกรัมของเซลล์เปียกของเอนไซม์ α-HSDH ที่ได้จากการใช้สับสเตรตทั้ง 3 ชนิดสูงที่สุด จึงน่าจะเป็นความเข้มข้นของเซลล์ที่เหมาะสมสำหรับใช้เตรียมสารละลายเอนไซม์เพื่อนำไปศึกษาและทำให้บริสุทธิ์ต่อไป

4.4 ผลการศึกษาความจำเพาะต่อสับสเตรตของเอนไซม์ α-HSDH ที่แยกได้จาก B. fuscum

เตรียมสารละลายเอนไซม์ (ข้อ 3.5.2) แล้วนำมาวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ α-HSDH (ข้อ 3.6.1) ที่อุณหภูมิ 30 °ซ โดยใช้สับสเตรตกรดน้ำดีชนิดต่าง ๆ คือ กรดโคลิก (3α, 7α, 12α-trihydroxy), กรดคีออกซีโคลิก (3α, 12α-dihydroxy), กรดคีโนคีออกซีโคลิก (3α, 7α-dihydroxy) และกรดลิโทโคลิก (3α-hydroxy) รูปที่ 9 แสดงให้เห็นว่าสารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้จาก B. fuscum สามารถให้แอคติวิตีของเอนไซม์ α-HSDH ต่อสับสเตรตทั้ง 4 ชนิดได้แตกต่างกัน และเมื่อเปรียบเทียบค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ต่อสับสเตรตเหล่านี้ พบว่ากรดโคลิก และกรดคีออกซีโคลิก จะให้ค่าแอคติวิตีจำเพาะค่อนข้างสูง คือมีค่า 0.93 หน่วย/มก.โปรตีน และ 0.86 หน่วย/มก.โปรตีน สูงกว่ากรดคีโนคีออกซีโคลิก (0.26 หน่วย/มก.โปรตีน) และกรดลิโทโคลิก (0.07 หน่วย/มก.โปรตีน) ประมาณ 3 เท่า และ 12 เท่าตามลำดับ แสดงว่าสารละลายเอนไซม์ที่แยกได้จาก B. fuscum มีแอคติวิตีของเอนไซม์ α-HSDH ทั้ง 3 ชนิด คือ 3α-, 7α- และ 12α-HSDH อยู่รวมกัน และน่าจะมีแอคติวิตีของเอนไซม์ 12α-HSDH สูงกว่าเอนไซม์ 7α-HSDH ประมาณ 3 เท่า และสูงกว่าเอนไซม์ 3α-HSDH ประมาณ 12 เท่า

ตารางที่ 2 แสดงผลกระทบของความเข้มข้นเซลล์ต่อผลผลิตและแอคติวิตีของเอนไซม์ α-HSDH วัดแอคติวิตีโดยใช้กรดดีออกซีโคลิก (DCA), กรดดีโนดีออกซีโคลิก (CDCA), และกรดลิโทโคลิก (LCA) เป็นสับสเตรต

อัตราส่วนระหว่างจำนวนกรัมเซลล์ต่อมล.ของบัฟเฟอร์	ปริมาณโปรตีน (มก./มล.)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.โปรตีน)			แอคติวิตี (หน่วย/กรัมของเซลล์เปียก)		
		DCA	CDCA	LCA	DCA	CDCA	LCA
1 : 2	3.6	1.33	0.47	0.17	9.60	3.36	1.20
1 : 3	3.9	1.36	0.48	0.20	16.05	5.70	2.40
1 : 4	2.4	1.27	0.33	0.17	12.16	4.48	1.60
1 : 5	1.8	1.25	0.43	0.17	11.25	3.90	1.50
1 : 6	1.4	1.29	0.46	0.20	10.08	3.84	1.44



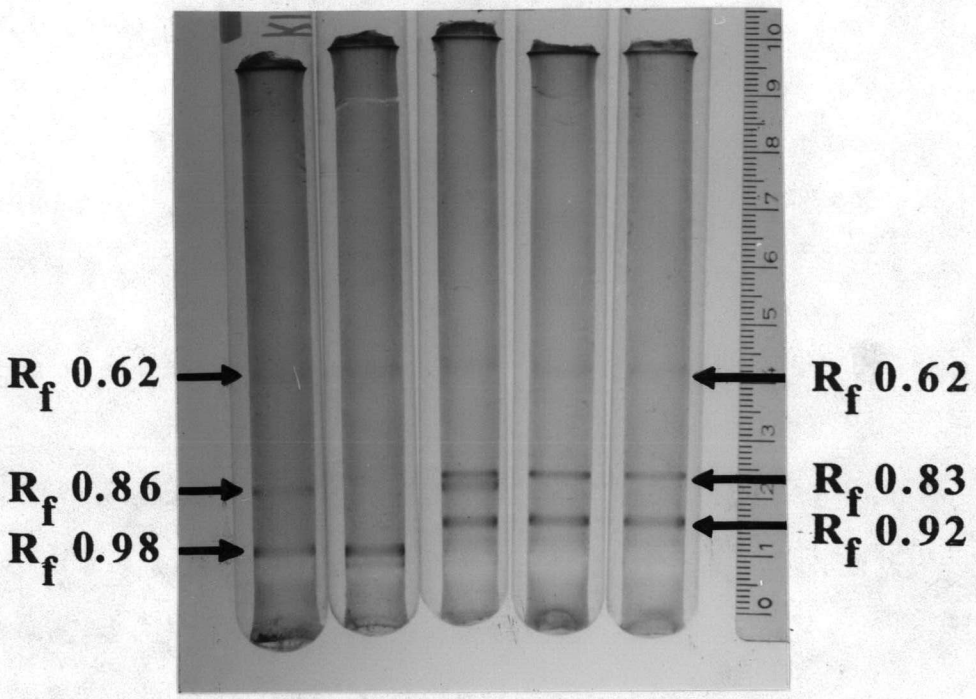
รูปที่ 9 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีของเอนไซม์ α-HSDH ของ B. fuscum กับปริมาณโปรตีน วัดแอคติวิตี (ข้อ 3.6.1) โดยใช้กรดโคลิก (CA), กรดดีออกซีโคลิก (DCA), กรดคีโนดีออกซีโคลิก (CDCA) และกรดลิโทโคลิก (LCA) เป็นสับสเตรต

4.5 ผลการใช้เทคนิคโพลีอะไครลาไมด์ เจล อีเลคโตรโฟรีซิสในการจำแนกชนิดของเอนไซม์ α-HSDH ที่แยกได้จาก B. fuscum

เมื่อนำสารละลายเอนไซม์ที่แยกได้จาก B. fuscum มาทำอีเลคโตรโฟรีซิส (วิธีข้อ 3.9.5) โดยแบ่งเป็น 2 ชุด ๆ หนึ่งนำมาย้อมสีแอคติวิตี (ข้อ 3.9.5.5) ส่วนอีกชุดหนึ่งนำมาตัดเป็นท่อน ๆ บดให้ละเอียดแล้วแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์นาน 24 ชั่วโมง (ข้อ 3.9.5.6) และนำมาวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ (ข้อ 3.6.1)

ผลการย้อมสีแอคติวิตีในแท่งโพลีอะไครลาไมด์ เจล เมื่อใช้กรดน้ำดีชนิดต่าง ๆ เป็นสับสเตรต แสดงดังรูปที่ 10 ซึ่งจะเห็นได้ว่าเมื่อย้อมสีโดยใช้โซเดียมโคเลท (มีหมู่แอลฟา-ไฮดรอกซิล ที่ตำแหน่ง 3, 7 และ 12) และโซเดียมดีออกซีโคเลท (มีหมู่แอลฟา-ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 3 และ 12) ซึ่งเป็นสับสเตรตที่ละลายในน้ำได้ดี จะพบแถบสี 2 แถบ (แสดงถึงแอคติวิตีของเอนไซม์) ที่มีค่า R_f ตรงกัน คือ R_f 0.62 และ 0.98 ซึ่งคาดว่าเป็นของเอนไซม์ 3α-HSDH และ 12α-HSDH ตามลำดับ ส่วนแถบสีอีกแถบหนึ่งมีค่า R_f 0.86 ที่พบเมื่อใช้โซเดียมโคเลทเป็นสับสเตรต แต่ไม่พบเมื่อใช้โซเดียมดีออกซีโคเลทเป็นสับสเตรตนั้นคาดว่าเป็นของเอนไซม์ 7α-HSDH และจะสังเกตเห็นว่าแถบสีที่ค่า R_f 0.62 ที่คาดว่าเป็นของเอนไซม์ 3α-HSDH นั้นจะมีสีจางกว่าแถบสีที่คาดว่าเป็นของเอนไซม์ 12α-HSDH (R_f 0.98) และ 7α-HSDH (R_f 0.86) ซึ่งน่าจะมีสาเหตุเนื่องมาจากเอนไซม์ 3α-HSDH มีแอคติวิตีต่ำกว่าเอนไซม์ 12α- และ 7α-HSDH

เมื่อทำการย้อมสีแอคติวิตีโดยใช้กรดคีโนดีออกซีโคลิก (มีหมู่แอลฟา-ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 3 และ 7) และกรดลิโทโคลิก (มีหมู่แอลฟา-ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 3 เพียงตำแหน่งเดียว) เป็นสับสเตรตเปรียบเทียบกับเมื่อใช้เอทานอลเป็นสับสเตรตร่วมด้วย ผลการศึกษาเปรียบเทียบ (รูปที่ 10) จะเห็นได้ว่าสามารถพบแถบสี 3 แถบ ที่ค่า R_f ตรงกัน คือแถบสีที่ค่า R_f 0.62 กับ 0.83 รวมทั้ง 0.92 ซึ่งคาดว่าเป็นของตัวทำละลายเอทานอล (กรดคีโนดีออกซีโคลิกและกรดลิโทโคลิกละลายในน้ำได้น้อยมาก จึงต้องละลายในเอทานอล) และสำหรับแอคติวิตีของเอนไซม์ที่พบเมื่อใช้กรดลิโทโคลิกเป็นสับสเตรตนั้นจะพบแถบสี 3 แถบที่สอดคล้องคล้ายกันกับเมื่อใช้เอทานอลเป็นสับสเตรตเท่านั้น โดยไม่สามารถตรวจพบแถบสีอื่นเพิ่มขึ้นมาอย่างเด่นชัดได้อีกเลย ในขณะที่การย้อมสีแอคติวิตีโดยใช้กรดคีโนดีออกซีโคลิกเป็นสับสเตรต จะพบแถบสีอีกแถบหนึ่งที่ค่า R_f 0.86 เพิ่มขึ้นมาจากแถบสีเจลที่ใช้เอทานอลและกรดลิโทลิกเป็นสับสเตรต



รูปที่ 10 ผลการจำแนกชนิดของเอนไซม์ α-HSDH จาก B. fuscum โดยเทคนิคโพลีอะไครลาไมด์ เจล อีเลคโตรโฟรีซิส (โปรตีน 150 ไมโครกรัม) ย้อมสีแอคติวิตี (วิธีข้อ 3.9.5.5) ด้วยสับสเตรตชนิดต่าง ๆ ดังนี้ คือ

(1) โซเดียมโคเลท (ละลายในน้ำ)

(2) โซเดียมดีออกซีโคเลท (ละลายในน้ำ)

(3) กรดคีโนดีออกซีโคลิก (ละลายในเอทานอล)

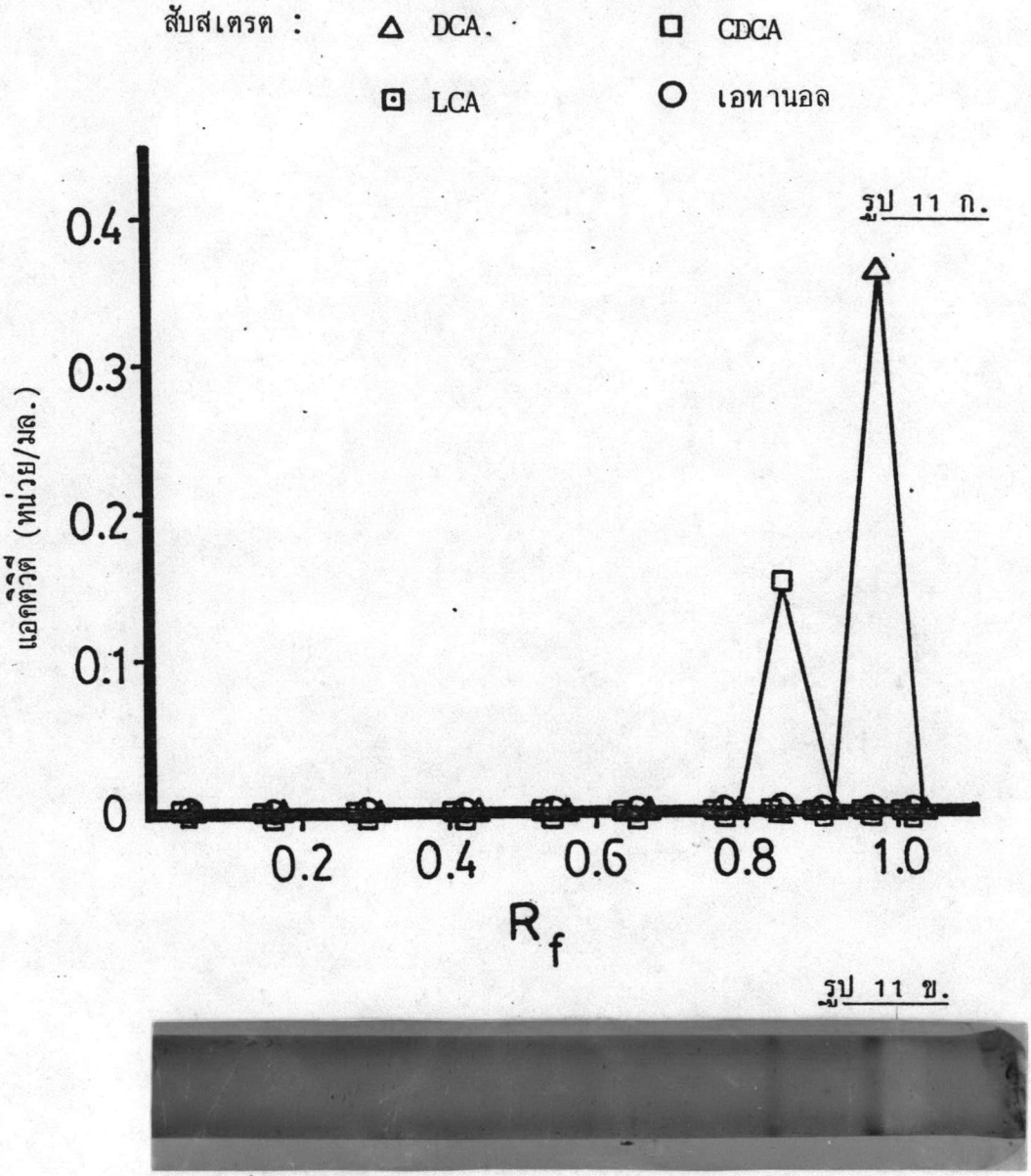
(4) กรดลิโทโคลิก (ละลายในเอทานอล)

(5) เอทานอล

ซึ่งแถบสีนี้ (R_f 0.86) น่าจะเป็นผลเนื่องจากแอคติวิตีของเอนไซม์ 7α-HSDH และผลที่ได้ตรงกับแถบสีที่เป็นผลจากการย้อมสีแอคติวิตีของแท่งเจลเมื่อใช้สับสเตรตเป็นโซเดียมโคเลทที่พบแถบสีของเอนไซม์แอคติวิตี R_f 0.86 ด้วย

แม้ว่าผลการย้อมสีแอคติวิตีโดยใช้กรดลิโทโคลิกและกรดคีโนดีออกซีโคลิกเป็นสับสเตรตจะไม่สามารถตรวจพบแถบสีที่คาดว่าเป็นของเอนไซม์ 3α-HSDH เพิ่มขึ้นมาจากแถบสีเมื่อใช้เอทานอลเป็นสับสเตรต แต่ผลการย้อมสีแอคติวิตีโดยใช้โซเดียมโคเลท และโซเดียมดีออกซี-โคเลทซึ่งปราศจากผลกระทบจากเอทานอล ก็ได้แสดงให้เห็นตรงกันว่าแถบสีที่ค่า R_f 0.62 น่าจะเป็นของเอนไซม์ 3α-HSDH และที่น่าสังเกตก็คือแถบสีนี้มีค่า R_f ตรงกับแถบสีแถบหนึ่งของแอคติวิตีของเอนไซม์ เมื่อใช้เอทานอลเป็นสับสเตรต ด้วยเหตุนี้การย้อมสีแอคติวิตีไม่ว่าจะใช้กรดคีโนดีออกซีโคลิกหรือกรดลิโทโคลิกที่ละลายในเอทานอลเป็นสับสเตรตจึงไม่สามารถตรวจพบแถบสีที่คาดว่าเป็นของเอนไซม์ 3α-HSDH แยกขัดหรือเพิ่มขึ้นมาจากแถบสีเมื่อใช้เอทานอลเป็นสับสเตรตได้

ผลการวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ α-HSDH ในแท่งโพลีอะไครลาไมด์ เจล โดยการตัดเจลเป็นท่อน ๆ (รูปที่ 11) ยืนยันว่า ช่วง R_f 0.85-0.91 มีแอคติวิตีของเอนไซม์เมื่อวัดโดยใช้กรดคีโนดีออกซีโคลิกเป็นสับสเตรต แต่ไม่ปรากฏแอคติวิตีของเอนไซม์ไม่ว่าจะวัดโดยใช้กรดดีออกซีโคลิก, กรดลิโทโคลิก หรือแม้แต่เอทานอลเป็นสับสเตรต ในทำนองเดียวกัน ช่วง R_f 0.98-1.03 ก็จะให้แอคติวิตีของเอนไซม์ต่อเมื่อวัดโดยใช้กรดดีออกซีโคลิกเป็นสับสเตรต แต่ไม่พบแอคติวิตีของเอนไซม์ไม่ว่าจะวัดโดยใช้กรดคีโนดีออกซีโคลิก, กรดลิโทโคลิก และเอทานอลเป็นสับสเตรต ทั้งนี้แอคติวิตีสูงสุดเมื่อวัดโดยใช้กรดดีออกซีโคลิกเป็นสับสเตรต (0.36 หน่วย/มิลลิลิตร) จะมีค่ามากกว่าเมื่อวัดโดยใช้กรดคีโนดีออกซีโคลิกเป็นสับสเตรต (0.15 หน่วย/มิลลิลิตร) ประมาณ 2 เท่า สำหรับแอคติวิตีของเอนไซม์เมื่อวัดโดยใช้กรดลิโทโคลิกเป็นสับสเตรตนั้น ไม่สามารถตรวจพบได้ ณ ตำแหน่งใด ๆ บนแท่งเจล ซึ่งอาจเป็นเพราะเอนไซม์ 3α-HSDH ที่จะให้แอคติวิตีต่อสับสเตรตชนิดนี้มีแอคติวิตีต่ำเกินกว่าจะตรวจพบได้ในแท่งเจล ดังนั้นโดยการใช้เทคนิคโพลีอะไครลาไมด์เจล อีเลคโตรโฟรีซิส อาจจำแนกเอนไซม์ α-HSDH ในสารละลายเอนไซม์ที่แยกได้จาก B. fuscum ออกได้เป็น 3 ชนิดคือ เอนไซม์ 3α-HSDH (R_f 0.62), 7α-HSDH (R_f 0.86) และ 12α-HSDH (R_f 0.98)



รูปที่ 11 ผลการจำแนกชนิดของเอนไซม์ α-HSDH ที่แยกได้จาก B. fuscum โดยเทคนิคโพลีอะไครลาไมด์ เจล อีเลคโตรโฟรีซิส วัดแอคติวิตีของเจลที่ตัดเป็นท่อน (รูป ก.) ตามวิธีข้อ 3.6.1 และย้อมสีแอคติวิตีในแท่งเจล (รูป ข.) เมื่อใช้โซเดียมโคเลทเป็นสับสเตรต ตามวิธีข้อ 3.9.5.5

4.6 การศึกษาผลกระทบของ 2-เมอร์แคปโตเอทธานอลและกลีเซอรอลต่อความเสถียรของเอนไซม์ α-HSDH

เตรียมสารละลายเอนไซม์ (ข้อ 3.5.2) ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เสริมด้วยกลีเซอรอลและ 2-เมอร์แคปโตเอทานอล ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน แล้วเก็บสารละลายเอนไซม์ที่เตรียมได้ไว้ที่อุณหภูมิ 7 °ซ หลังจากนั้นนำสารละลายเหล่านั้นมาวัดแอคติวิตีโดยใช้กรดคีออกซีโคลิกและกรดคีโนคีออกซีโคลิกเป็นสับสเตรต (ข้อ 3.6.1) ในช่วงเวลาต่าง ๆ กัน นาน 12 วัน

ผลการทดลอง (รูปที่ 12) แสดงให้เห็นว่าแอคติวิตีของเอนไซม์ α-HSDH ที่วัดได้ไม่ว่าจะใช้กรดคีออกซีโคลิกหรือกรดคีโนคีออกซีโคลิกเป็นสับสเตรตก็ตามจะพบรูปแบบการลดลงของแอคติวิตีคล้าย ๆ กัน ที่แตกต่างกันเล็กน้อยก็คือ แอคติวิตีเมื่อวัดโดยใช้กรดคีโนคีออกซีโคลิกเป็นสับสเตรตจะลดลงเร็วกว่าแอคติวิตีเมื่อวัดโดยใช้กรดคีออกซีโคลิกเป็นสับสเตรต

เมื่อศึกษาผลกระทบของ 2-เมอร์แคปโตเอทานอลต่อความเสถียรของเอนไซม์ โดยเตรียมเอนไซม์ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นของ 2-เมอร์แคปโตเอทานอลต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ 0-0.1 เปอร์เซนต์ ที่ความเข้มข้นของกลีเซอรอลคงที่ 20 เปอร์เซนต์ (รูปที่ 12 ก และ ข) พบว่า เมื่อมี 2-เมอร์แคปโตเอทานอลความเข้มข้นต่ำ ๆ (0-0.02 เปอร์เซนต์) รวมอยู่กับกลีเซอรอลความเข้มข้นคงที่ (20 เปอร์เซนต์) แอคติวิตีของเอนไซม์ α-HSDH จะลดลงค่อนข้างเร็วในช่วง 3 วันแรก หลังจากนั้นความเร็วของการลดแอคติวิตีจะช้าลงจนถึงวันที่ 12 ซึ่งจะมีแอคติวิตีเมื่อวัดโดยใช้กรดคีออกซีโคลิกและกรดคีโนคีออกซีโคลิกเป็นสับสเตรตลดลงเหลือประมาณ 50 และ 40 เปอร์เซนต์ตามลำดับ แต่เอนไซม์ α-HSDH จะมีความเสถียรดีขึ้นเมื่อความเข้มข้นของ 2-เมอร์แคปโตเอทานอลในสารละลายมีค่าสูงขึ้นเป็น 0.06 และ 0.1 เปอร์เซนต์ โดยเฉพาะที่ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซนต์นั้นจะสามารถรักษาแอคติวิตีของเอนไซม์ในระยะ 3 วันแรกของการเก็บรักษาได้โดยไม่ทำให้เกิดการสูญเสียแอคติวิตีเมื่อวัดโดยใช้กรดคีออกซีโคลิกเป็นสับสเตรตและมีแอคติวิตีลดลงเล็กน้อยหลังจากวันที่ 2 ของการเก็บรักษาเมื่อวัดแอคติวิตีโดยใช้กรดคีโนคีออกซีโคลิกเป็นสับสเตรต

เมื่อศึกษาผลกระทบของกลีเซอรอลต่อความเสถียรของเอนไซม์ โดยเตรียมเอนไซม์ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นของกลีเซอรอลต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ 0-20 เปอร์เซนต์ เมื่อกำหนดความเข้มข้นของ 2-เมอร์แคปโตเอทานอลคงที่ (0.1 เปอร์เซนต์) จะได้ผลการทดลองดังแสดงรูปที่ 12 ค และ ง ซึ่งจะเห็นว่าเมื่อไม่มีกลีเซอรอลหรือมีกลีเซอรอลที่ความเข้มข้นต่ำ 5 และ 10

รูปที่ 12 แสดงผลกระทบของกลีเซอรอล และ 2-เมอร์แคปโตเอทานอลต่อความเสถียรของเอนไซม์ α-HSDH จาก B. fuscum ที่อุณหภูมิ 7°ซ

(บน) ผลการเปรียบเทียบความเสถียรของเอนไซม์เมื่อเก็บรักษาไว้ในสารละลายโปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (50 มิลลิโมลาร์, พีเอช 6.8) ที่เสริมด้วยกลีเซอรอลเข้มข้นคงที่ 20 เปอร์เซนต์ และแปรเปลี่ยนความเข้มข้นของ 2-เมอร์แคปโตเอทานอล ตั้งแต่ 0-0.1 เปอร์เซนต์ ติดตามวัดแอคติวิตีของเอนไซม์โดยใช้สับสเตรตกรดคีออกซีโคลิก (รูป ก) และกรดคีโนคีออกซีโคลิก (รูป ข) (วิธีข้อ 3.6.1)

(ล่าง) ผลการเปรียบเทียบความเสถียรของเอนไซม์เมื่อเก็บรักษาไว้ในสารละลายโปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (50 มิลลิโมลาร์, พีเอช 6.8) ที่เสริมด้วย 2-เมอร์แคปโตเอทานอลเข้มข้นคงที่ 0.1 เปอร์เซนต์ และแปรเปลี่ยนความเข้มข้นของกลีเซอรอลตั้งแต่ 0-20 เปอร์เซนต์ ติดตามวัดแอคติวิตีของเอนไซม์โดยใช้สับสเตรตกรดคีออกซีโคลิก (รูป ค) และกรดคีโนคีออกซีโคลิก (รูป ง) (วิธีข้อ 3.6.1)

โปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์

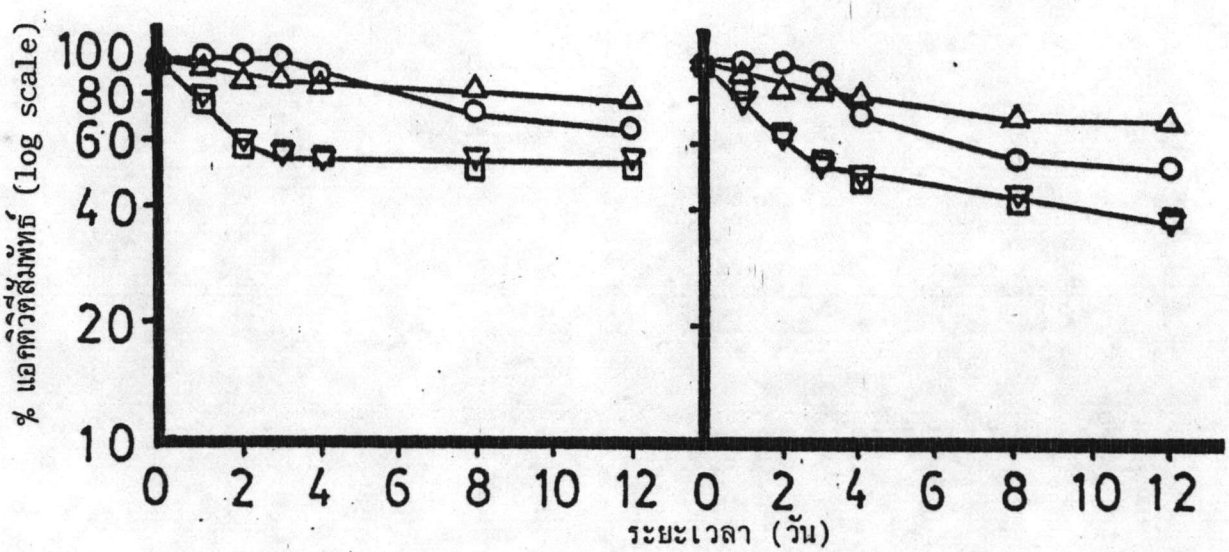
○ + 20% กลีเซอรอล + 0.1% 2-เมอร์แคปโตเอทานอล

△ + 20% กลีเซอรอล + 0.06% 2-เมอร์แคปโตเอทานอล

▽ + 20% กลีเซอรอล + 0.02% 2-เมอร์แคปโตเอทานอล

□ + 20% กลีเซอรอล

ก. กรดดีออกซีโคลิกเป็นสับสเตรต ข. กรดคีโนดีออกซีโคลิกเป็นสับสเตรต



โปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์

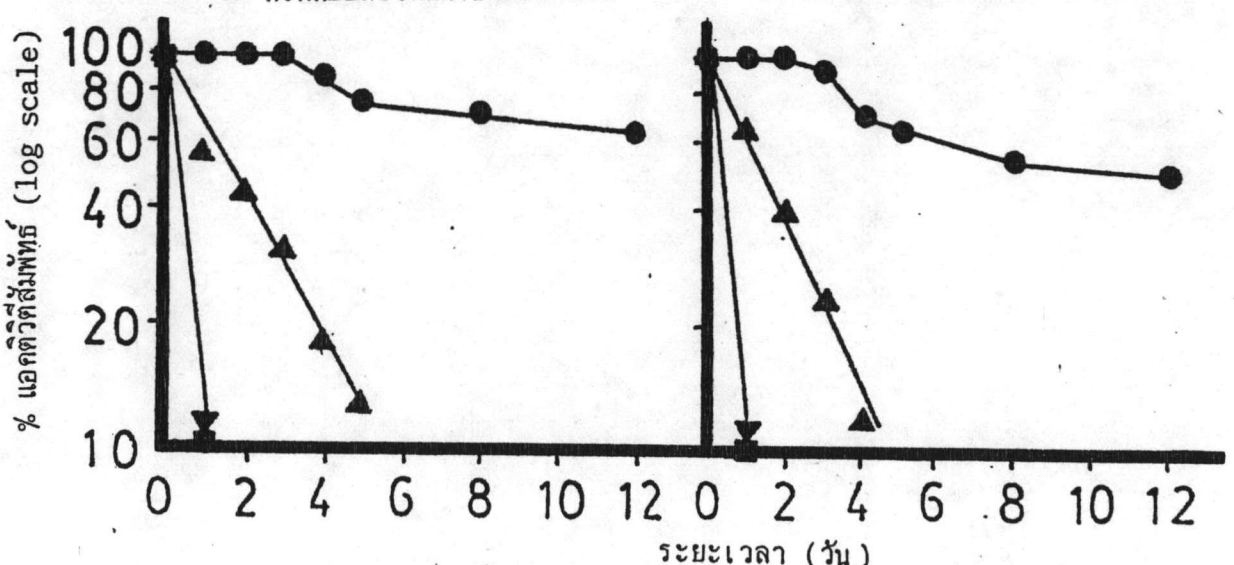
● + 20% กลีเซอรอล + 0.1% 2-เมอร์แคปโตเอทานอล

▲ + 10% กลีเซอรอล + 0.1% 2-เมอร์แคปโตเอทานอล

▼ + 5% กลีเซอรอล + 0.1% 2-เมอร์แคปโตเอทานอล

■ + 0.1% 2-เมอร์แคปโตเอทานอล

ค. กรดดีออกซีโคลิกเป็นสับสเตรต ง. กรดคีโนดีออกซีโคลิกเป็นสับสเตรต



รูปที่ 12

เปอร์เซนต์ เอนไซม์ α-HSDH จาก B. fuscum เมื่อวัดโดยใช้กรดดีออกซีโคลิกเป็นสับสเตรต จะสูญเสียแอคติวิตีอย่างรวดเร็ว และมีแอคติวิตีลดลงจนเป็นศูนย์ภายในระยะเวลาเพียง 2, 3 และ 12 วัน ตามลำดับ ในขณะที่ 20 เปอร์เซนต์ของกลีเซอรอลจะช่วยรักษาระดับแอคติวิตีของ α-HSDH ไว้ได้สูงถึง 60 เปอร์เซนต์ของแอคติวิตีเริ่มต้น รูปแบบของการลดลงของแอคติวิตีของ α-HSDH เมื่อวัดโดยใช้กรดคีโนออกซีโคลิกเป็นสับสเตรตจะคล้ายคลึงกันกับเมื่อใช้กรดดีออกซีโคลิก หากแต่ว่าอัตราการลดลงของแอคติวิตีเมื่อใช้กรดคีโนดีออกซีโคลิกจะรวดเร็วกว่าอย่างเห็นได้ชัด

จากการเปรียบเทียบผลของกลีเซอรอล และ 2-เมอร์แคปโตเอทานอลต่อความเสถียรของเอนไซม์ α-HSDH จาก B. fuscum พบว่า กลีเซอรอลน่าจะให้ผลต่อความเสถียรของเอนไซม์มากกว่า 2-เมอร์แคปโตเอทานอล แต่ 2-เมอร์แคปโตเอทานอลก็จำเป็นสำหรับความเสถียรของเอนไซม์เช่นเดียวกัน ดังนั้นเพื่อที่จะเพิ่มความเสถียรของเอนไซม์ให้มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น จึงต้องใช้ทั้งกลีเซอรอล และ 2-เมอร์แคปโตเอทานอลควบคู่กันไป นอกจากนี้ผลการศึกษาก็ได้แสดงให้เห็นว่า กลีเซอรอลเข้มข้น 20 เปอร์เซนต์ และ 2-เมอร์แคปโตเอทานอลเข้มข้น 0.1 เปอร์เซนต์ น่าจะเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับเสริมในสารละลายโปแตสเซียม-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (50 มิลลิโมลาร์, พีเอช 6.8) เพื่อช่วยเพิ่มความเสถียรของเอนไซม์α-HSDH จาก B. fuscum

4.7 ผลการศึกษาวิธีทำให้เอนไซม์ 12α-HSDH จาก B. fuscum บริสุทธิ์

นำสารละลายเอนไซม์ (crude enzyme) ที่ได้จากการเตรียมในข้อ 3.5.2 (ใช้อัตราส่วนของจำนวนกรัมเซลล์ต่อมิลลิลิตรของบัฟเฟอร์เป็น 1 ต่อ 3) มาทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านขั้นตอนต่าง ๆ (ข้อ 3.9) ได้ผลการวิจัยดังต่อไปนี้

ทุกขั้นตอนของการทดลองทำโดยควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 4-10 °ซ และสารละลาย 50 มิลลิโมลาร์โปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.8 ที่ใช้จะเสริมด้วย 20 เปอร์เซนต์-กลีเซอรอล และ 0.1 เปอร์เซนต์ 2-เมอร์แคปโตเอทานอลทุกครั้งตลอดการทดลองนี้

4.7.1 ผลการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

เมื่อทำการตกตะกอนโปรตีนในสารละลายเอนไซม์ด้วยการแปรเปลี่ยนปริมาณผงแอมโมเนียมซัลเฟตบดละเอียดที่มีค่าความเข้มข้นอิ่มตัวตั้งแต่ 30 จนถึง 80 เปอร์เซนต์ โดยการเพิ่มความเข้มข้นของเกลือแฟรคชัน ๆ ละ 10 เปอร์เซนต์ (วิธีข้อ 3.9.1) ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 3 ซึ่งพบว่าที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 30 และ 40

ตารางที่ 3 ผลการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 0-80 เปอร์เซนต์ โดยการเพิ่มความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต แฟรกชั่นละ 10 เปอร์เซนต์ (วิธีข้อ 3.9.1) วัดแอคติวิตีโดยใช้กรดดีออกซีโคลิก (DCA), กรดคีโนดีออกซีโคลิก (CDCA) และกรดลิโทโคลิก (LCA) เป็นสับสเตรต

แฟรกชั่นของแอมโมเนียมซัลเฟต	ปริมาตร (มล.)	โปรตีนรวม (มก.)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.โปรตีน)			แอคติวิตีรวม (หน่วย)			% ผลผลิต		
			DCA	CDCA	LCA	DCA	CDCA	LCA	DCA	CDCA	LCA
เอนไซม์เริ่มต้น	10	35.5	0.86	0.26	0.07	30.00	9.23	2.48	100	100	100
0-30%*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0-40%*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0-50%	3.4	1.0	0.67	0.26	0.06	0.63	0.21	0.04	2.10	2.28	1.61
0-60%	4	1.3	1.17	0.37	0.21	1.53	0.48	0.16	5.10	5.20	6.45
0-70%	6.4	12.2	1.87	0.64	0.13	22.81	7.87	1.59	76.03	85.26	64.11
0-75%	7.0	15.1	1.61	0.57	0.12	24.35	8.60	1.74	81.17	93.17	70.16
0-80%	7.2	13.4	1.77	0.66	0.13	23.79	8.86	1.79	79.30	96.00	72.18

* ไม่มีการตกตะกอนของโปรตีน

เปอร์เซนต์ จะไม่ปรากฏตะกอนของโปรตีนเลย จะเริ่มเห็นตะกอนของโปรตีนเล็กน้อยที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 50 และ 60 เปอร์เซนต์ และเพิ่มมากขึ้นที่ความเข้มข้น 70, 75 และ 80 เปอร์เซนต์ ค่าแอคติวิตีจำเพาะและเปอร์เซนต์ผลผลิตของเอนไซม์ α-HSDH ทั้ง 3 ชนิด จะมีค่าใกล้เคียงกันสำหรับการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 70, 75 และ 80 เปอร์เซนต์ ในการทดลองจึงเลือกตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 75 เปอร์เซนต์ ซึ่งจะทำให้เอนไซม์ 12α-HSDH, 7α-HSDH และ 3α-HSDH มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นประมาณ 1.9, 2.2 และ 1.7 เท่า ตามลำดับ หลังจากนั้นนำตะกอนโปรตีนที่แยกได้ไปผ่านคอลัมน์ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 ต่อไป

4.7.2 ผลการแยกเอนไซม์ 3α-HSDH, 7α-HSDH และ 12α-HSDH ออกจากกันโดยคอลัมน์ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50

4.7.2.1 คอลัมน์ I ชะด้วย Step-wise elution

นำตะกอนของโปรตีนที่แยกได้จากข้อ 4.7.1 มาละลายในบัฟเฟอร์แล้วไดอะไลซ์เอาเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตออก หลังจากนั้นผ่านลงในคอลัมน์ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 แล้วทำการชะด้วย 0.2 โมลาร์โซเดียมคลอไรด์ในโปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และติดตามด้วย 0.5 โมลาร์โซเดียมคลอไรด์ในโปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (วิธีข้อ 3.9.2.2) ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 13 ซึ่งจะเห็นว่าสามารถแยกโปรตีนออกได้เป็น 2 ส่วนใหญ่ ๆ โดยส่วนแรกที่ออกจากคอลัมน์ด้วยความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0.2 โมลาร์ จะเป็นโปรตีนที่ไม่มีแอคติวิตีของเอนไซม์ α-HSDH อยู่เลย หรือมีในปริมาณที่น้อยมาก สำหรับส่วนที่ 2 ซึ่งออกจากคอลัมน์ด้วยความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0.5 โมลาร์ จะเป็นส่วนที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์ 3α-, 7α-, และ 12α-HSDH รวมอยู่ในปริมาณมาก และสังเกตได้ว่าแอคติวิตีสูงสุดของเอนไซม์ 12α-HSDH จะมีค่าเป็น 2 เท่า และ 12.5 เท่าของเอนไซม์ 7α-HSDH และ 3α-HSDH ตามลำดับ จากนั้นนำโปรตีนส่วนนี้ไปทำให้บริสุทธิ์สูงขึ้น โดยใช้คอลัมน์ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 อีกครั้งหนึ่ง

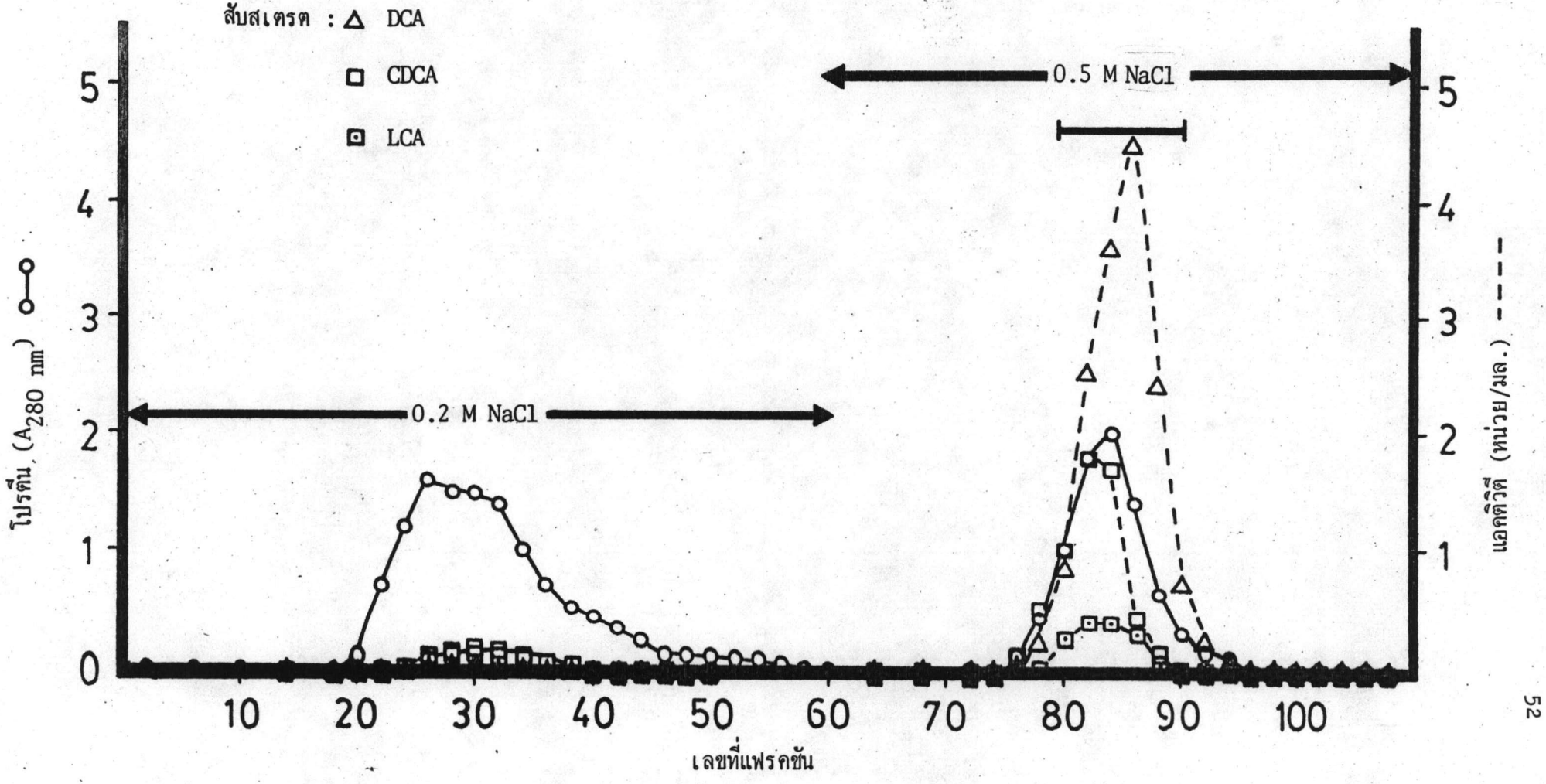
4.7.2.2 คอลัมน์ II ชะด้วย Linear salt gradient elution

ผ่านสารละลายเอนไซม์จากข้อ 4.7.2.1 ซึ่งไดอะไลซ์เอาเกลือโซเดียมคลอไรด์ออกแล้ว ลงในคอลัมน์ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 ชะด้วย 0.2 โมลาร์โซเดียมคลอไรด์ในโปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จนไม่มีโปรตีนออกจากคอลัมน์อีกต่อไป จึงเปลี่ยนเป็นชะด้วย linear salt gradient วัดแอคติวิตีของเอนไซม์และความเข้มข้นโปรตีน

รูปที่ 13 DEAE-Sephadex A-50 column (I)

ผลการแยกโปรตีนจาก 75% แอมโมเนียมซัลเฟตแฟรคชันโดยคอลัมน์ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 (I) (ขนาด 5×10 ซม.) ชะด้วย 0.2 โมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ในโปแตสเซียม-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เก็บแฟรคชันจำนวน 60 หลอด (หลอดละ 10 มล.) แล้วเปลี่ยนเป็นชะด้วย 0.5 โมลาร์โซเดียมคลอไรด์ ในโปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์จำนวน 50 หลอด (หลอดละ 10 มล.) อัตราการไหล 30 มล./ชม. ทำการวัดความเข้มข้นของโปรตีนและแอคติวิตีของเอนไซม์ α-HSDH (วิธีข้อ 3.9.2.2)

⟝⟞ รวมแฟรคชัน 12α-HSDH


สับสเตรต : △ DCA
□ CDCA
⊡ LCA
0.5 M NaCl
0.2 M NaCl
โปรตีน ($A_{280\ nm}$)
แอคติวิตี (หน่วย/มล.)
เลขที่แฟรคชัน
0
1
2
3
4
5
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100

(วิธีข้อ 3.9.2.3) ผลการทดลอง (รูปที่ 14) พบว่าสามารถแยกแอคติวิตีของเอนไซม์ α-HSDH ออกได้เป็น 3 ส่วน ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่าง ๆ กัน โดยในส่วนแรกที่ออกจากคอลัมน์ด้วยความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0.26-0.29 โมลาร์ จะมีแอคติวิตีของเอนไซม์ 3α-HSDH เป็นส่วนใหญ่โดยมีแอคติวิตีของเอนไซม์ 7α-HSDH ปะปนอยู่เล็กน้อย ส่วนที่ 2 ออกจากคอลัมน์ด้วยความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0.28-0.33 โมลาร์ จะมีแอคติวิตีของเอนไซม์ 7α-HSDH เป็นส่วนใหญ่ และมีแอคติวิตีของเอนไซม์ 3α-HSDH และ 12α-HSDH เป็นส่วนน้อย สำหรับในส่วนสุดท้ายซึ่งออกจากคอลัมน์ด้วยความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0.32-0.38 โมลาร์ นั้นจะมีแอคติวิตีของเอนไซม์ 12α-HSDH เป็นส่วนใหญ่ มีแอคติวิตีของเอนไซม์ 7α-HSDH ปะปนอยู่บ้างเป็นส่วนน้อย หลังจากรวมแฟรคชันที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์ 12α-HSDH (แฟรคชันที่ 63 ถึง 75) โดยไม่ให้มีแอคติวิตีของเอนไซม์ 7α-HSDH หรือ 3α-HSDH เจือปนแล้วนำไปแยกให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์แอฟฟินิตีต่อไป

4.7.3 ผลการทำให้เอนไซม์ 12α-HSDH บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นโดยคอลัมน์แอฟฟินิตีกรดดีไฮโดรโคลิก-เซฟาโรส 4 บี

4.7.3.1 คอลัมน์ I ชะด้วย Linear salt gradient elution

เมื่อทำการตรวจวัดปริมาณกรดดีไฮโดรโคลิกในกรดดีไฮโดรโคลิก-เซฟาโรส 4 บี เจล โดยการนำกรดดีไฮโดรโคลิก-เซฟาโรส 4 บี เจล ที่เตรียมได้ (ข้อ 3.9.3.1) มาวิเคราะห์ตามรายละเอียดวิธีการข้อ 3.9.3.2 โดยใช้กราฟมาตรฐานของกรดดีไฮโดรโคลิก (ภาคผนวกที่ 5) พบว่าปริมาณของกรดดีไฮโดรโคลิกที่จับเป็นลิแกนด์อยู่กับเซฟาโรส 4 บี ที่เตรียมได้ในการทดลองนี้มีค่าประมาณ 1 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตรของปริมาตร packed gel

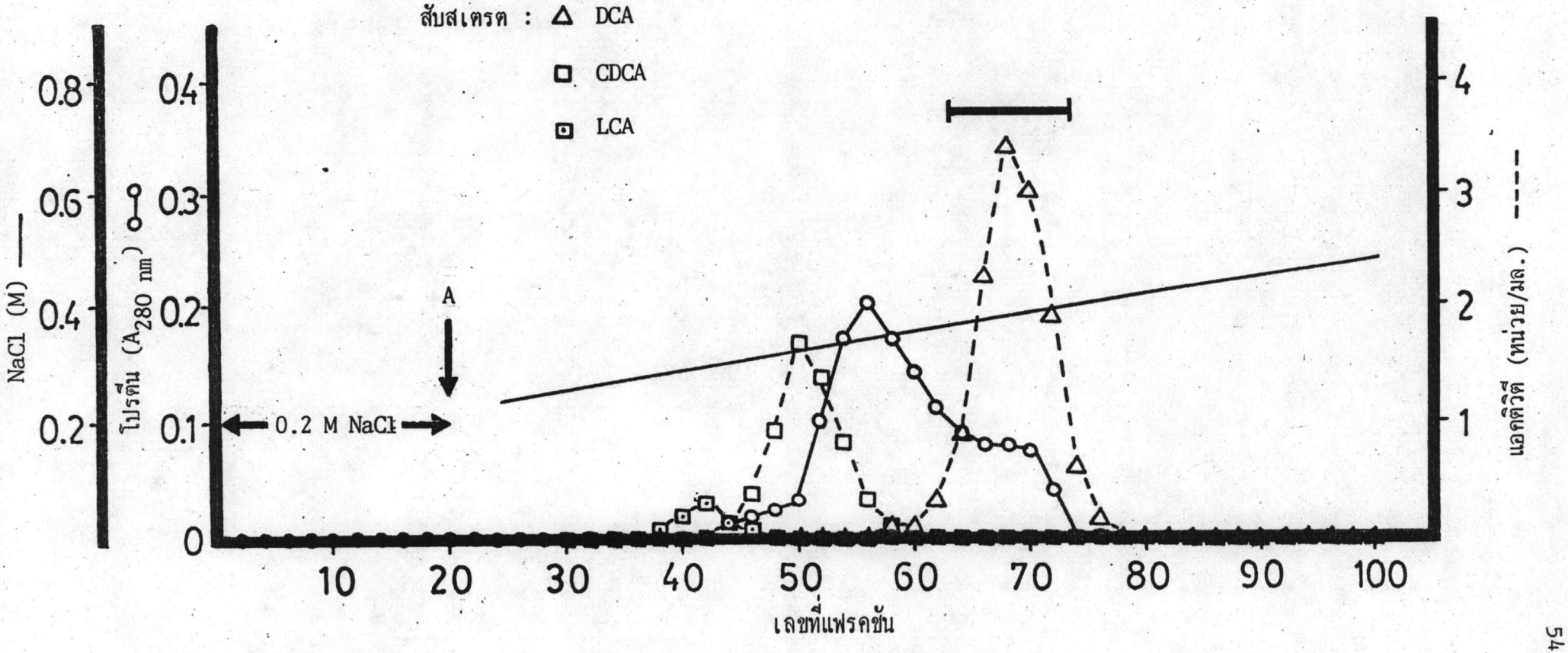
หลังจากนำสารละลายเอนไซม์จากข้อ 4.7.2.2 ที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์ 12α-HSDH เป็นส่วนใหญ่ และตรวจไม่พบแอคติวิตีของเอนไซม์ 7α-HSDH หรือ 3α-HSDH เจือปนอยู่เลยไปไดอะไลซ์ เอาเกลือโซเดียมคลอไรด์ออกแล้วนำมาทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นโดยผ่านลงในคอลัมน์แอฟฟินิตีกรดดีไฮโดรโคลิก-เซฟาโรส 4 บี แล้วทำการชะโดยวิธี linear salt gradient elution เก็บแยกส่วนสารละลายที่ออกจากคอลัมน์หลอดละ 6 มิลลิลิตร จำนวน 80 หลอด ทำการวัดความเข้มข้นโปรตีนและแอคติวิตีของเอนไซม์ 12α-HSDH (ข้อ 3.9.3.4) ผลการทดลอง (รูปที่ 15) สามารถตรวจพบพีคที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์ 12α-HSDH ออกจากคอลัมน์ที่ช่วงความเข้มข้นของโปแตสเซียมคลอไรด์ 0.36-0.54 โมลาร์ ทำการรวมแฟรคชัน

รูปที่ 14 DEAE-Sephadex A-50 column (II)

ผลการแยกเอนไซม์ 3α-HSDH, 7α-HSDH และ 12α-HSDH จากโปรตีน ส่วนที่แยกได้จากคอลัมน์ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 (I) โดยคอลัมน์ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 (II) (ขนาด 2×10 ซม.) ชะด้วย linear salt gradient (500 มล. ของ 0.2 โมลาร์โซเดียมคลอไรด์ในโปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และ 500 มล. ของ 0.6 โมลาร์โซเดียมคลอไรด์ในโปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์) อัตราการไหล 30 มล./ชม. แบ่งเก็บแยกส่วนหลอดละ 10 มล. (วิธีทดลองข้อ 3.9.2.3)

ลูกศร A เริ่มชะด้วย linear salt gradient

⟝⟞ รวมแฟรคชัน 12α-HSDH

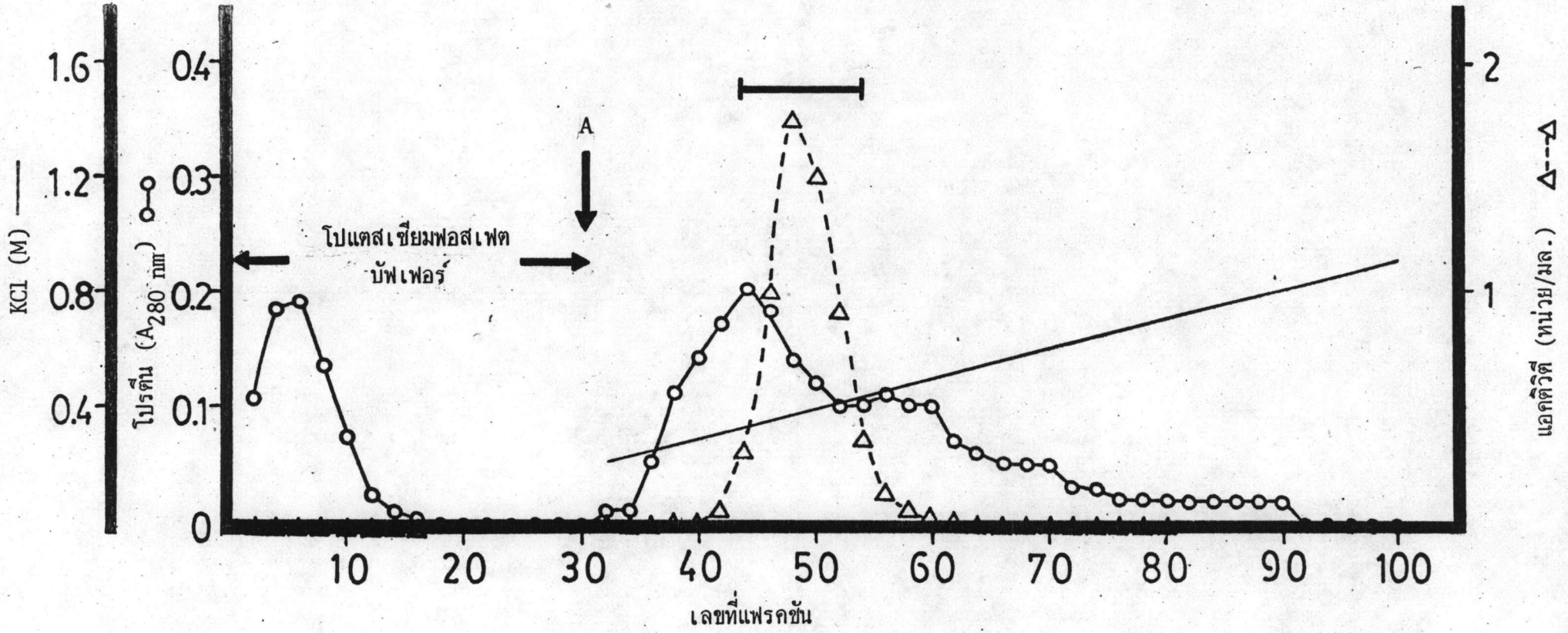

สับสเตรต : DCA
CDCA
LCA
NaCl (M) ——
โปรตีน ($A_{280\ nm}$)
---- (นาโนโมล/มล.)
0.2 M NaCl
A
0.8
0.6
0.4
0.2
0.4
0.3
0.2
0.1
0
4
3
2
1
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
เลขที่แฟรคชัน

<u>รูปที่ 15</u> Dehydrocholic acid-Sepharose 4B column (I)

ผลการแยกเอนไซม์ 12α-HSDH จากคอลัมน์ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 (II) โดยคอลัมน์กรดดีไฮโดรโคลิก-เซฟาโรส 4 บี (I) (ขนาด 1.4×5 ซม.) ชะด้วย linear salt gradient (250 มล. ของ 0.2 โมลาร์โปแตสเซียมคลอไรด์ ในโปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และ 250 มล. ของ 1.0 โมลาร์โปแตสเซียม-คลอไรด์ ในโปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์) อัตราการไหล 20 มล./ชม. แบ่งเก็บแยกส่วนหลอดละ 6 มล. (วิธีทดลองข้อ 3.9.3.4)

ลูกศร A เริ่มชะด้วย linear salt gradient

⟝⟞ รวมแฟรคชัน 12α-HSDH


KCl (M) ——
โปรตีน ($A_{280\ nm}$) o—o
แอคติวิตี (หน่วย/มล.) Δ--Δ
โปแตสเซียมฟอสเฟต
บัฟเฟอร์
A
1.6
1.2
0.8
0.4
0.4
0.3
0.2
0.1
0
2
1
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
เลขที่แฟรคชัน

แล้วนำสารละลายเอนไซม์ที่ได้ไปวัดแอคติวิตีของเอนไซม์และความเข้มข้นโปรตีน หลังจากนั้นนำไปแยกให้บริสุทธิ์ขึ้นในคอลัมน์กรดดีไฮโดรโคลิก-เซฟาโรส 4 บี อีกครั้งหนึ่ง

4.7.3.2 คอลัมน์ II ชะด้วย Specific elution

หลังจากไดอะไลซ์สารละลายเอนไซม์จากข้อ 4.7.3.1 จนกระทั่งความเข้มข้นของเกลือโปแตสเซียมคลอไรด์ออกหมดแล้ว ผ่านลงในคอลัมน์กรดดีไฮโดรโคลิก-เซฟาโรส 4 บี ชะด้วยโปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์จำนวน 75 มิลลิลิตร แล้วเปลี่ยนเป็นชะด้วย 40 มิลลิโมลาร์โซเดียมโคเลทในโปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เก็บแยกส่วนสารละลายที่ออกจากคอลัมน์หลอดละ 2.5 มิลลิลิตร จำนวน 60 หลอด (วิธีข้อ 3.9.3.5) ผลการทดลอง (รูปที่ 16) จะได้พีคแอคติวิตีของเอนไซม์ 12α-HSDH ที่ทับเกือบซ้อนกับพีคของโปรตีน (แสดงโดยค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร) แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ที่แยกได้น่าจะมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นมากแต่ก็อาจยังไม่บริสุทธิ์อย่างแท้จริง

4.7.4 ผลการทำให้เอนไซม์ 12α-HSDH บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นโดยคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-150

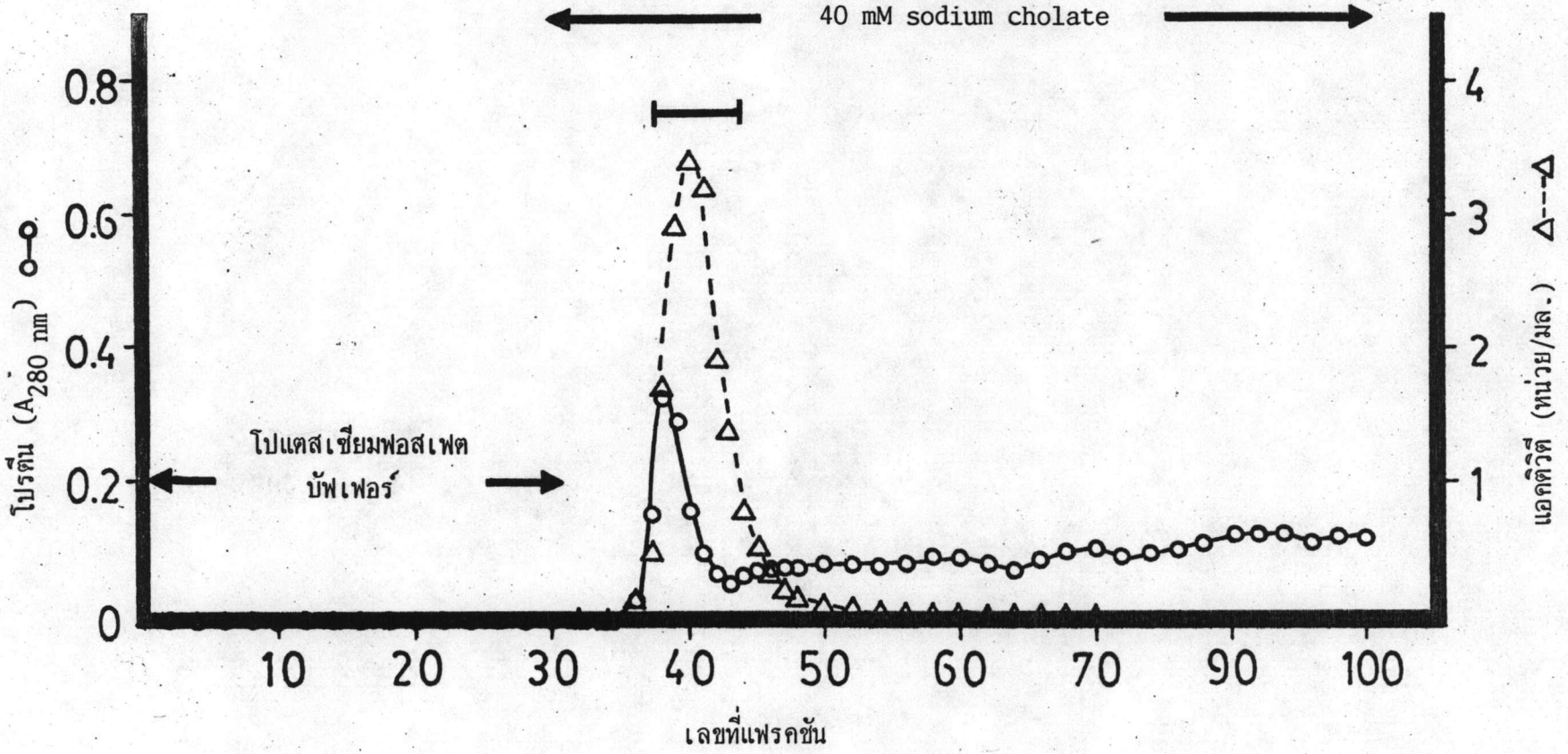
ผ่านสารละลายเอนไซม์จากข้อ 4.7.3.2 ลงในคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-150 ชะด้วยโปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เก็บแยกส่วนสารละลายที่ออกจากคอลัมน์หลอดละ 6 มิลลิลิตร จำนวน 60 หลอด (วิธีข้อ 3.9.4.2) ผลการทดลอง (รูปที่ 17) จะเห็นได้ว่ารูปแบบของผลการแยกเอนไซม์ปรากฏเป็นพีคแอคติวิตีของเอนไซม์ 12α-HSDH ที่ทับเกือบสนิทกับพีคของโปรตีน (รูปที่ 16)

ผลการทำให้เอนไซม์ 12α-HSDH บริสุทธิ์ได้สรุปไว้ในตารางที่ 4 ซึ่งกล่าวได้ว่า เมื่อนำสารละลายเอนไซม์เริ่มต้นที่เตรียมได้มาผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ตามวิธีในข้อ 3.9 โดยเริ่มจากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตแล้วตามด้วยคอลัมน์ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 สามารถแยกเอนไซม์ 12α-HSDH ให้ปลอดจากการปนเปื้อนของเอนไซม์ 7α-HSDH และ 3α-HSDH ได้เป็นผลสำเร็จในขณะที่ได้เอนไซม์บริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 4 เท่า เมื่อทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นด้วยคอลัมน์แอฟฟินิตีกรดดีไฮโดรโคลิก-เซฟาโรส 4 บี จะได้เอนไซม์ 12α-HSDH แยกออกมาและมีค่าแอคติวิตีจำเพาะเพิ่มขึ้นถึง 23 เท่า สำหรับการใช้คอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-150 ซึ่งเป็นขั้นตอนการแยกด้วยความแตกต่างของขนาดโมเลกุล ในขั้นตอนสุดท้ายของการทำให้บริสุทธิ์นั้นไม่สามารถช่วยให้เอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น (แอคติวิตีจำเพาะ 23 เท่าคงเดิม) และทำให้ผลผลิตของเอนไซม์ลดลงไปอีกด้วย เอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วเมื่อนำไปศึกษาถึงคุณสมบัติต่าง ๆ ให้ผลการทดลองดังต่อไปนี้

<u>รูปที่ 16</u> Dehydrocholic acid Sepharose 4B column (II)

ผลการแยกเอนไซม์ 12α-HSDH จากคอลัมน์กรดดีไฮโดรโคลิก-เซฟาโรส 4 บี (I) ด้วยคอลัมน์กรดดีไฮโดรโคลิก-เซฟาโรส 4 บี (II) (ขนาด 1.4×5 ซม.) ชะด้วย 40 มิลลิโมลาร์โซเดียมโคเลทในโปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ อัตราการไหล 20 มล./ชม. แบ่งเก็บแยกส่วนหลอดละ 2.5 มล. (วิธีทดลองข้อ 3.9.3.5)

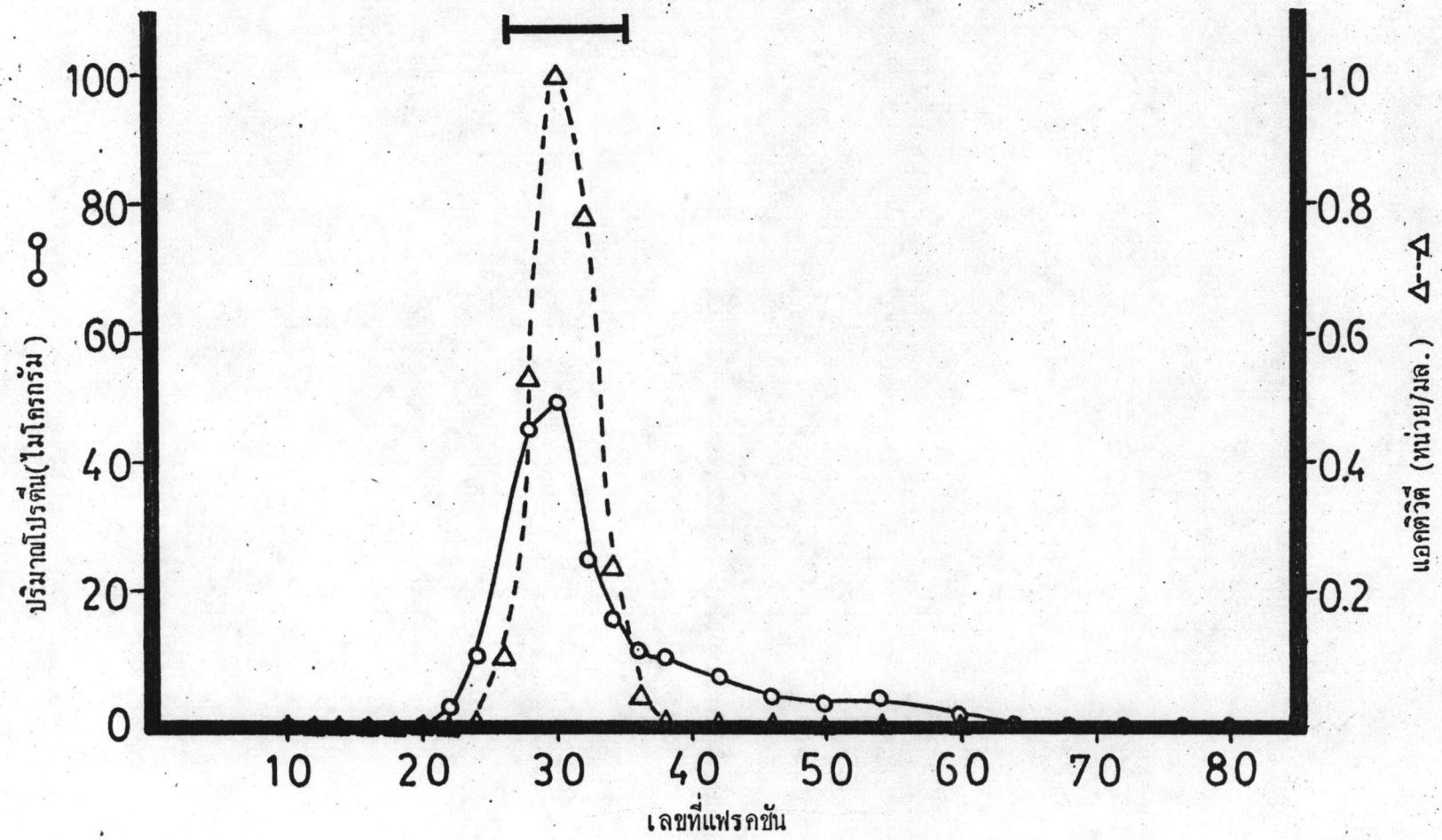
⟷ รวมแฟรคชัน 12α-HSDH


40 mM sodium cholate
โปรตีน ($A_{280\ nm}$)
โปแตสเซียมฟอสเฟต
บัฟเฟอร์
0.8
0.6
0.4
0.2
0
4
3
2
1
10
20
30
40
50
60
70
90
100
เลขที่แฟรคชัน
แอคติวิตี (หน่วย/มล.)

รูปที่ 17 Sephadex G-150 column

ผลการแยกเอนไซม์ 12α-HSDH จากคอลัมน์กรดดีไฮโดรโคลิก-เซฟาโรส 4 บี (II) โดยคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-150 (ขนาด 2.5×57.5 ซม.) ชะด้วยโปแตสเซียมฟอสเฟต-บัฟเฟอร์ อัตราการไหล 15 มล./ชม. แบ่งเก็บแยกส่วนหลอดละ 6 มล. (วิธีทดลอง ข้อ 3.9.4.2)

⟝⟞ รวมแฟรคชัน 12α-HSDH


100
80
60
40
20
0
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
10
20
30
40
50
60
70
80
ปริมาณโปรตีน(ไมโครกรัม)
แอคติวิตี (หน่วย/มล.)
เลขที่แฟรคชัน

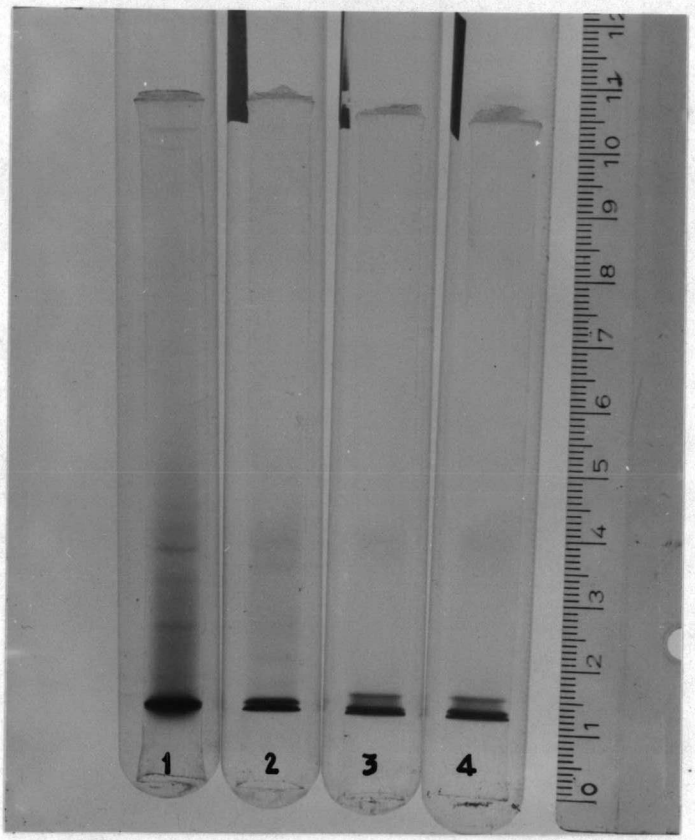
ตารางที่ 4 สรุปผลการทำให้เอนไซม์ 12α-HSDH บริสุทธิ์ ตามขั้นตอนต่าง ๆ ในข้อ 3.9

ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์	ปริมาตร (มล.)	โปรตีนรวม (มก.)	แอคติวิตีรวม (หน่วย)	แอคติวิตีจำเพาะ ((หน่วย/มก.)	% ผลผลิต	Purification fold
crude enzyme	150	555.8	456.00	0.82	100	1
ตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 75%	100	233.4	420.00	1.80	92.0	2.2
DEAE-Sephadex A-50 (I) (ชะด้วย 0.5M NaCl)	122	118.3	256.20	2.16	56.00	2.6
DEAE-Sephadex A-50 (II) (ชะด้วย NaCl gradient)	65	39.6	130.00	3.28	28.50	4.0
DHCA-Sepharose 4B (I) (ชะด้วย KCl gradient)	63	11.9	58.28	4.86	12.78	5.9
DHCA-Sepharose 4B (II) (ชะด้วย 40 mM โซเดียมโคเลท)	28	1.9	42.00	19.12	9.21	23.3
Sephadex G-150	53	0.95	18.25	19.21	4.00	23.4

4.8 ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์โดยเทคนิคโพลีอะไครลาไมด์ เจล อีเลคโตร-โฟริซิส

นำสารละลายเอนไซม์ที่สกัดแยกได้จากเซลล์ B. fuscum ในขั้นตอนที่ 1 (crude enzyme) และเอนไซม์ที่ผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ถึงขั้นที่แยกได้จากคอลัมน์ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 (II) (ข้อ 4.7.2.2), ที่แยกได้จากคอลัมน์กรดดีไฮโดรโคลิก-เซฟาโรส 4 บี (II) (ข้อ 4.7.3.2) และที่แยกได้จากคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-150 (ข้อ 4.7.4) มาทำอีเลคโตรโฟริซิส (ข้อ 3.9.5) แล้วย้อมสีโปรตีน (ข้อ 3.9.5.4) ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 18 ซึ่งจะเห็นว่าเอนไซม์ 12α-HSDH น่าจะเป็นโปรตีนส่วนใหญ่ที่พบในสารละลายที่สกัดแยกจากเซลล์ตั้งแต่เริ่มต้นและยิ่งเมื่อทำให้บริสุทธิ์มากขึ้น ทั้งขั้นตอนที่แยกได้จากคอลัมน์ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 นั้นจะเริ่มสังเกตเห็นแถบโปรตีนที่คาดว่าเป็นของเอนไซม์ 12α-HSDH ปรากฏเป็นแถบหนาติดกับแถบของสีตามรอยในขณะที่แถบของโปรตีนชนิดอื่น ๆ มีจำนวนลดลง โดยเฉพาะหลังจากที่ผ่านคอลัมน์กรดดีไฮโดรโคลิก-เซฟาโรส 4 บี แถบโปรตีนที่คาดว่าเป็นของเอนไซม์ 12α-HSDH จะยิ่งปรากฏชัดเจนยิ่งขึ้น (มีจำนวนมากกว่า 1 แถบ) และยังจะเห็นอีกด้วยว่ารูปแบบโปรตีนบนแท่งเจลของเอนไซม์ที่แยกได้จากคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-150 จะคล้ายกันกับของเอนไซม์ที่แยกได้จากคอลัมน์กรดีไฮโดรโคลิก-เซฟาโรส 4 บี มาก แสดงว่าขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์หลังจากคอลัมน์กรด-ดีไฮโดรโคลิก-เซฟาโรส 4 บี (II) โดยคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-150 ไม่ได้มีส่วนช่วยให้เอนไซม์ 12α-HSDH บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นกว่าเดิมได้มากนัก ดังนั้นในการศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ ในการวิจัยนี้จึงใช้เอนไซม์ที่ผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์จนถึงขั้นที่แยกได้จากคอลัมน์กรดดีไฮโดรโคลิก-เซฟาโรส 4 บี (II) เพราะแม้ว่าจะไม่ได้แถบของเอนไซม์ 12α-HSDH เป็นแถบของโปรตีนเพียงชนิดเดียวในแท่งเจล แต่จำนวนแถบของโปรตีนชนิดอื่นก็น้อยลงไปมากจนเกือบจะเห็นแถบของเอนไซม์ 12α-HSDH แต่เพียงอย่างเดียว

เมื่อนำสารละลายเอนไซม์ที่แยกได้จากคอลัมน์ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 (II) และที่แยกได้จากคอลัมน์กรดดีไฮโดรโคลิก-เซฟาโรส 4 บี (II) มาทำอีเลคโตรโฟรีซิสที่อุณหภูมิ 7 °ซ แล้วนำมาย้อมสีแอคติวิตีโดยใช้กรดโคลิก (ละลายในเอทานอล) เป็นสับสเตรต (วิธีข้อ 3.9.5.5) พบว่าเอนไซม์ที่แยกได้จากคอลัมน์ทั้ง 2 ชนิด จะให้แถบสีซึ่งแสดงถึงแอคติวิตีของเอนไซม์เพียงแถบเดียวที่ค่า R_f 0.98 (รูปที่ 19 และ 20) ตรงกับค่า R_f ที่คาดว่าเป็นของเอนไซม์ 12α-HSDH (ข้อ 4.5) โดยไม่ปรากฏแถบสีอื่นที่คาดว่าเป็นของเอทานอล หรือเอนไซม์ 7α-HSDH หรือ 3α-HSDH เลย และเมื่อเปรียบเทียบตำแหน่งของแถบสีแอคติวิตีดังกล่าวกับตำแหน่งของแถบสี



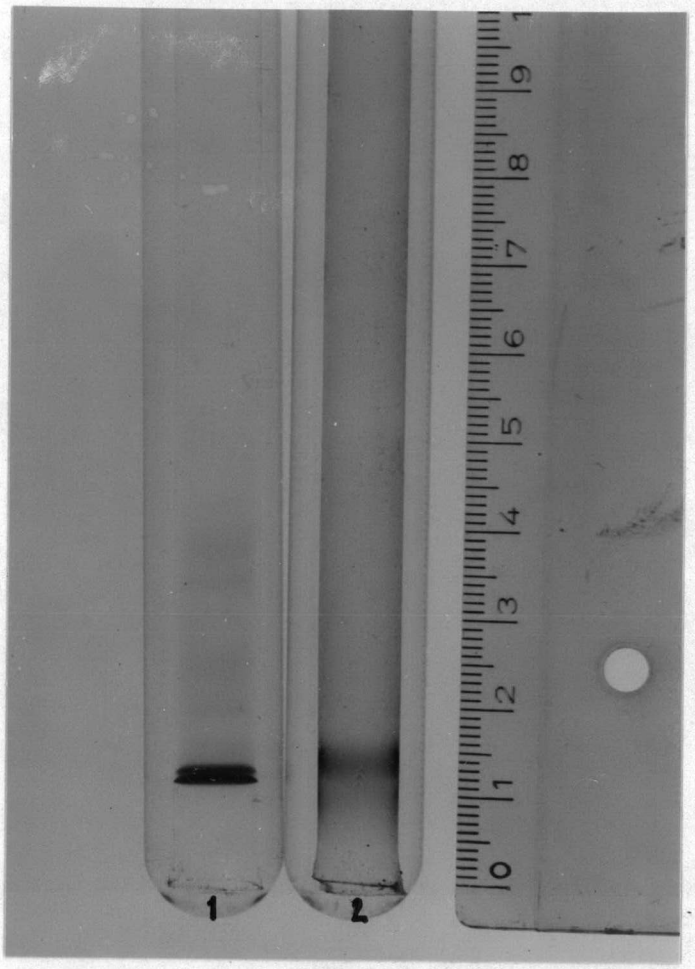
รูปที่ 18 รูปแบบของโปรตีนที่ได้จากขั้นตอนต่าง ๆ ของการทำให้เอนไซม์ 12α-HSDH บริสุทธิ์ แยกโดยเทคนิคโพลีอะไครลาไมด์เจล อีเลคโตรโฟรีซิส (โปรตีน 80 ไมโครกรัม) รายละเอียดของการทดลองตามวิธีในข้อ 3.9.5.4

(1) crude enzyme

(2) 12α-HSDH จากคอลัมน์ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 (II)

(3) 12α-HSDH จากคอลัมน์กรดดีไฮโดรโคลิก-เซฟาโรส 4 บี (II)

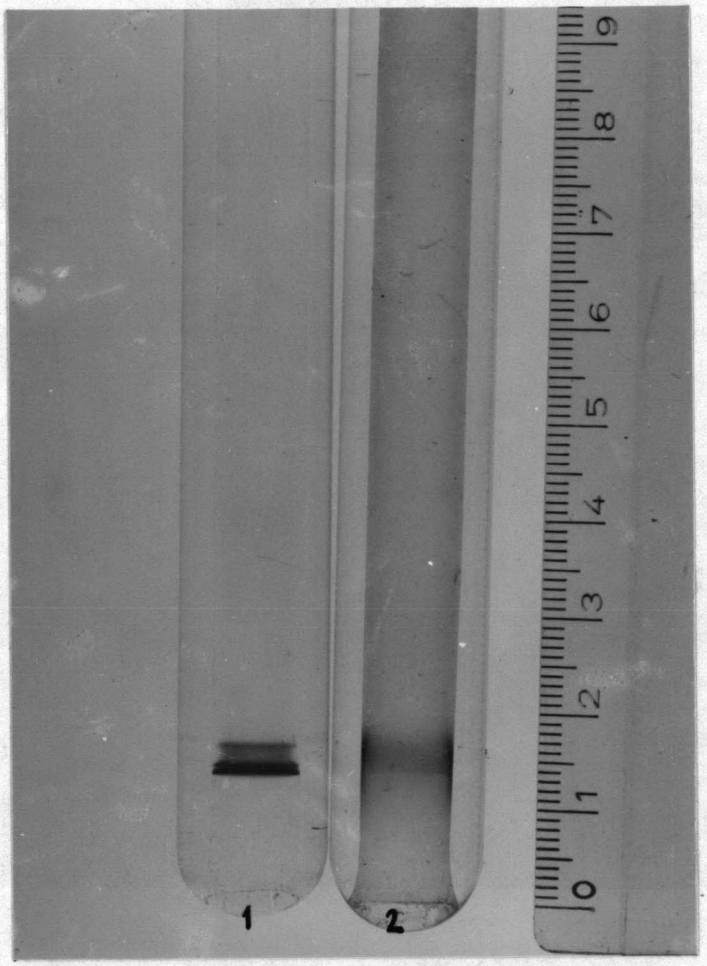
(4) 12α-HSDH จากคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-150



รูปที่ 19 เปรียบเทียบผลการย้อมสีโปรตีน (วิธีข้อ 3.9.5.4) และผลการย้อมสีแอคติวิตี (วิธีข้อ 3.9.5.5) ของเอนไซม์ 12α-HSDH ที่แยกได้จากคอลัมน์ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 (II) โดยวิธีโพลีอะไครลาไมด์ เจล อีเลคโตรโฟรีซิส (โปรตีน 80 ไมโครกรัม)

(1) ย้อมสีโปรตีน

(2) ย้อมสีแอคติวิตีโดยใช้กรดโคลิก (ละลายในเอทานอล) เป็นสับสเตรต



รูปที่ 20 เปรียบเทียบผลการย้อมสีโปรตีน (วิธีข้อ 3.9.5.4) และผลการย้อมสีแอคติวิตี (วิธีข้อ 3.9.5.5) ของเอนไซม์ 12α-HSDH ที่แยกได้จากคอลัมน์กรดดีไฮโดรโคลิก-เซฟาโรส 4 บี (II) โดยวิธีโพลีอะไครลาไมด์ เจล อีเลคโตรโฟรีซีส (โปรตีน 80 ไมโครกรัม)

(1) ย้อมสีโปรตีน

(2) ย้อมสีแอคติวิตีโดยใช้กรดโคลิก (ละลายในเอทานอล) เป็นสับสเตรต

โปรตีน (รูปที่ 19 และ 20) ก็จะเห็นได้ว่ามีตำแหน่งที่ตรงกัน ดังนั้นแถบโปรตีนที่มีตำแหน่งติดกับสีตามรอย ซึ่งเริ่มปรากฏขึ้นหลังจากที่ผ่านคอลัมน์ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 จึงน่าจะเป็นของเอนไซม์ 12α-HSDH

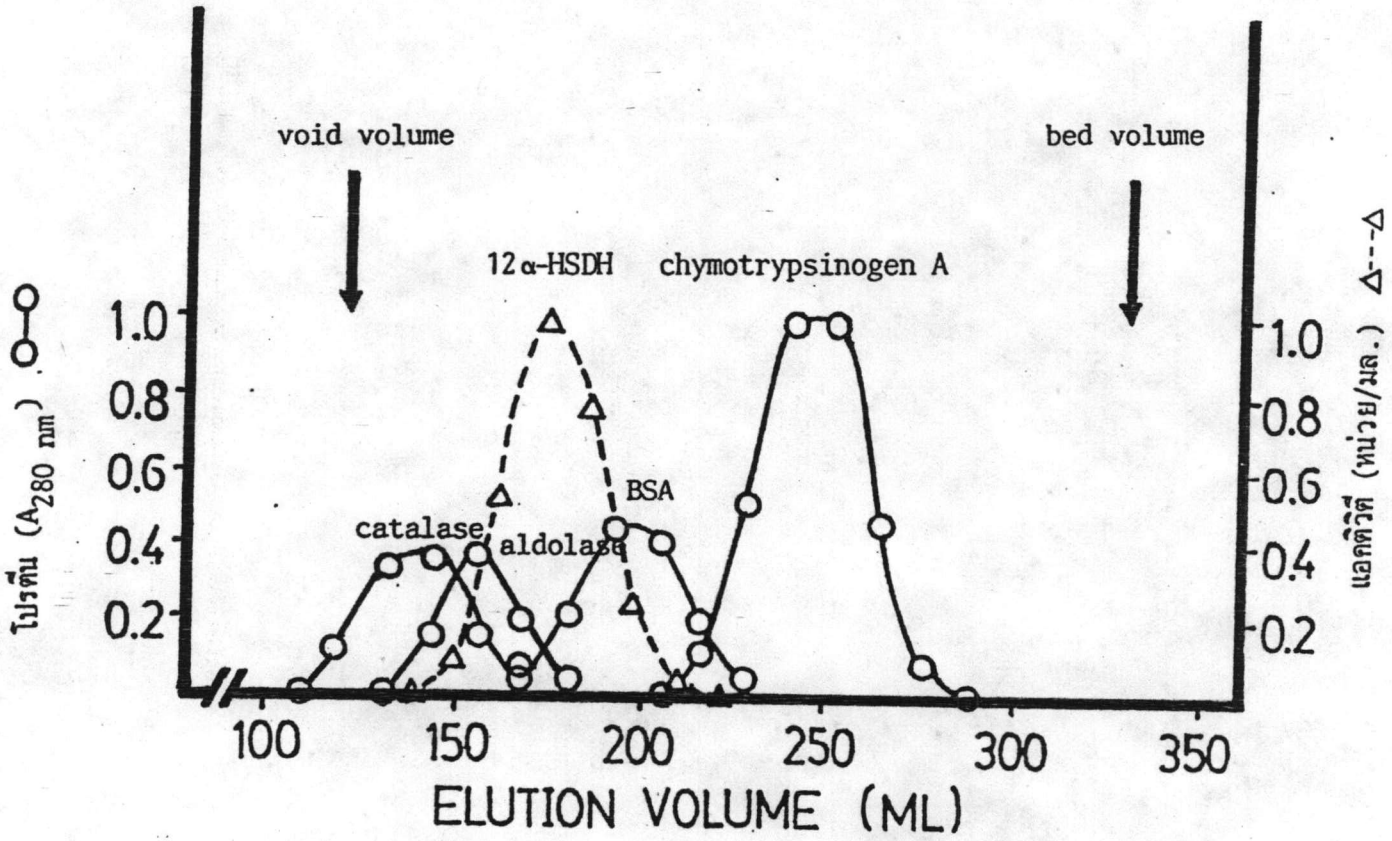
4.9 ผลการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ 12α-HSDH ที่มีความบริสุทธิ์สูง

4.9.1 ผลการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลโดยการใช้คอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-150

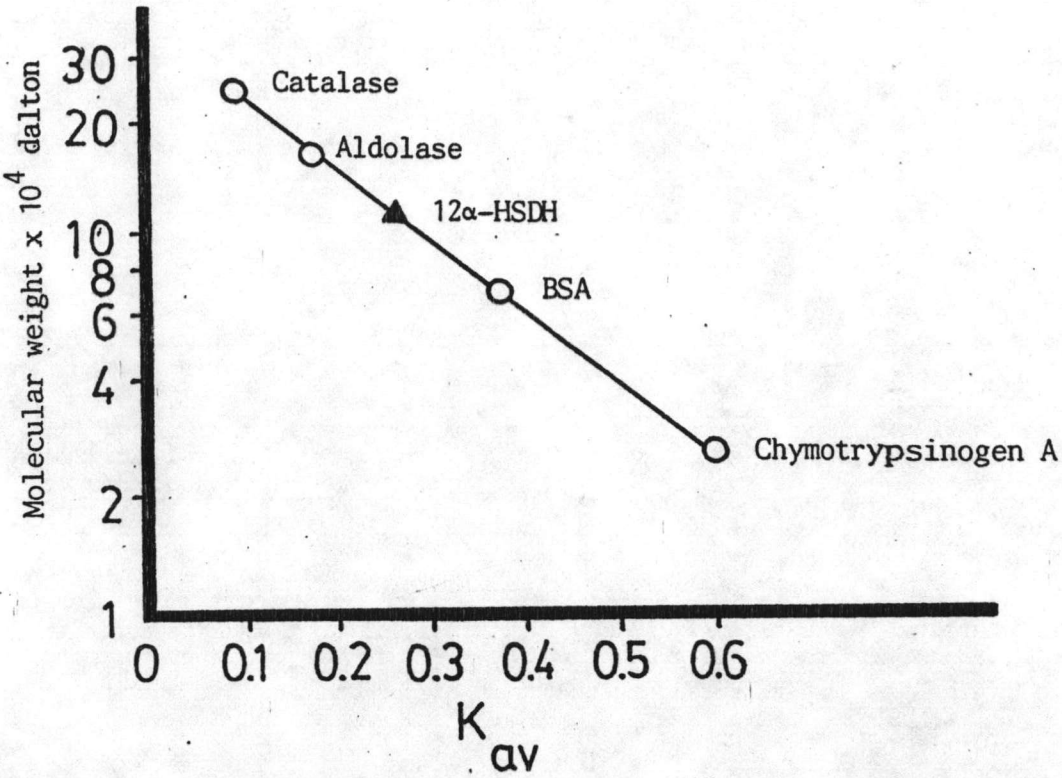
ผ่านสารละลายโปรตีนมาตรฐาน และสารละลายเอนไซม์ 12α-HSDH ลงในคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-150 แล้วชะด้วยโปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (วิธีข้อ 3.10.1) ผลการทดลอง (รูปที่ 21) แสดงให้เห็นว่าโปรตีนมาตรฐานคาตาเลส, อัลโดเลส, BSA และไดโมทริบซิโนเจน เอ จะถูกชะออกจากคอลัมน์ด้วย elution volume 140, 156, 198, 246 มิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่เอนไซม์ 12α-HSDH จะออกจากคอลัมน์หลังโปรตีนมาตรฐานอัลโดเลสเล็กน้อย คือมีค่า elution volume 174 มิลลิลิตร เมื่อนำมาคำนวณค่า K_{av} แล้วเทียบกับกราฟมาตรฐาน (รูปที่ 22) พบว่าเอนไซม์ 12α-HSDH มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 110,000 ดาลตัน

4.9.2 ผลการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของหน่วยย่อยเอนไซม์ด้วยวิธีเอสดีเอส-โพลีอะไครลาไมด์ เจล อีเลคโตรโฟรีซิส

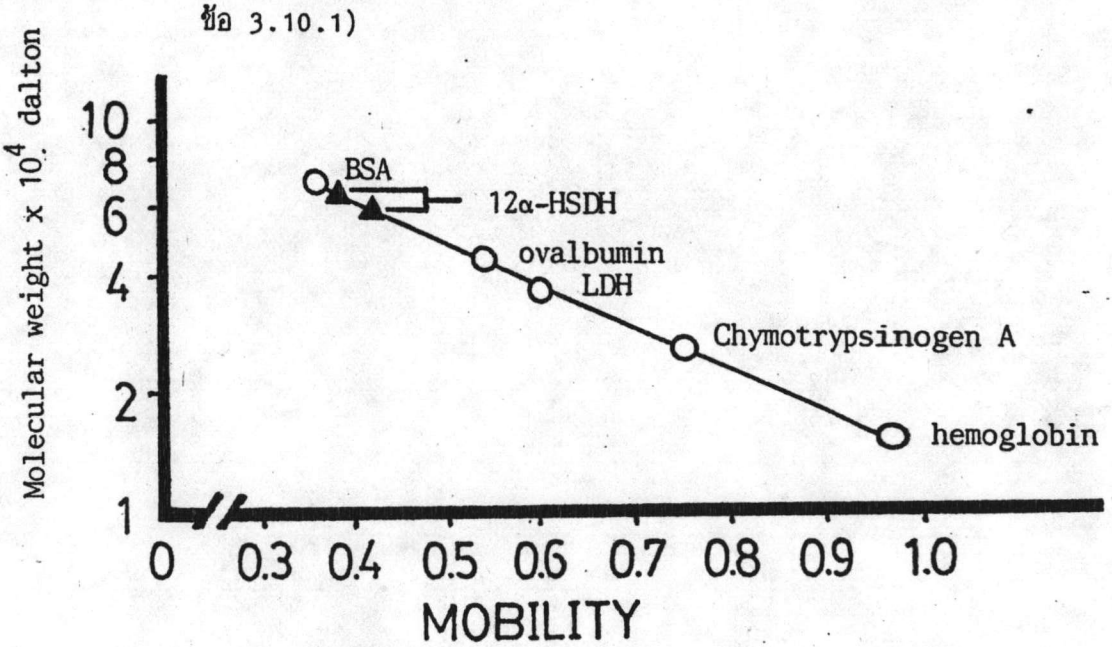
นำสารละลายเอนไซม์จากข้อ 4.7.3.2 มาทำอีเลคโตรโฟรีซิสโดยวิธีเอสดีเอส (วิธีข้อ 3.10.2) ผลการทดลองพบว่าสารละลายเอนไซม์ที่นำมาศึกษายังไม่บริสุทธิ์อย่างแท้จริง เพราะนอกจากจะพบแถบสีเข้ม 2 แถบที่ค่า mobility 0.38 และ 0.42 ซึ่งคาดว่าจะเป็นของเอนไซม์ 12α-HSDH แล้ว ที่ระดับต่ำลงมายังพบว่ามีแถบสีจาง ๆ ซึ่งคาดว่าเป็นของโปรตีนชนิดอื่นที่เจือปนอยู่ด้วย เมื่อนำสารละลายเอนไซม์มาทำอีเลคโตรโฟรีซิสควบคู่ไปกับโปรตีนมาตรฐาน พบว่าโปรตีนมาตรฐาน BSA, โอวัลบูมิน, แลคเตตดีไฮโดรจีเนส, ไดโมทริบซิโนเจน เอ และฮีโมโกลบินจะมีการเคลื่อนที่ในแท่ง เอสดีเอส-โพลีอะไครลาไมด์ เจล ซึ่งแสดงโดยค่า mobility เรียงตามลำดับดังนี้คือ 0.36, 0.54, 0.60, 0.75 และ 0.97 โดยแถบโปรตีนสีเข้ม 2 แถบที่คาดว่าจะเป็นของเอนไซม์ 12α-HSDH จะมีตำแหน่งใกล้กับแถบของ BSA ซึ่งเมื่อเทียบกับกราฟมาตรฐาน (รูปที่ 23) สามารถอ่านค่าน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนทั้ง 2 แถบนี้ได้ประมาณ 64,000 และ 58,000 ดาลตัน ดังนั้นเอนไซม์ 12α-HSDH จึงน่าจะเป็นโปรตีนที่ประกอบขึ้นด้วย 2 หน่วยย่อย (subunit) หรือเป็นไดเมอร์ (dimer) และมีน้ำหนักโมเลกุลเมื่อรวมทั้ง 2 หน่วยย่อย



รูปที่ 21 รูปแบบของโปรตีนมาตรฐานและเอนไซม์ 12α-HSDH ในการหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ 12α-HSDH (โปรตีน 2 มิลลิกรัม) โดยคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-150 (ขนาดคอลัมน์ 2.5×57.5 เซนติเมตร) ตามวิธีทดลองในข้อ 3.10.1



รูปที่ 22 เส้นกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง K_{av} และ log ของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน ในการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ 12α-HSDH โดยคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-150 (ขนาด 2.5×57.5 ซม.) (วิธีทดลองข้อ 3.10.1)



รูปที่ 23 เส้นกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง mobility และ log ของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน ในการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ 12α-HSDH โดยวิธีเอสดีเอส-โพลีอะไครลาไมด์ เจล อีเลคโตรโฟรีซิส (วิธีทดลองข้อ 3.10.2)

เข้าด้วยกันประมาณ 122,000 ดาลตัน ใกล้เคียงกับผลการหาน้ำหนักโมเลกุลโดยคอลัมน์เซฟา-เด็กซ์ จี -150 (ข้อ 4.9.1)

4.9.3 ผลการศึกษาพีเอชที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์

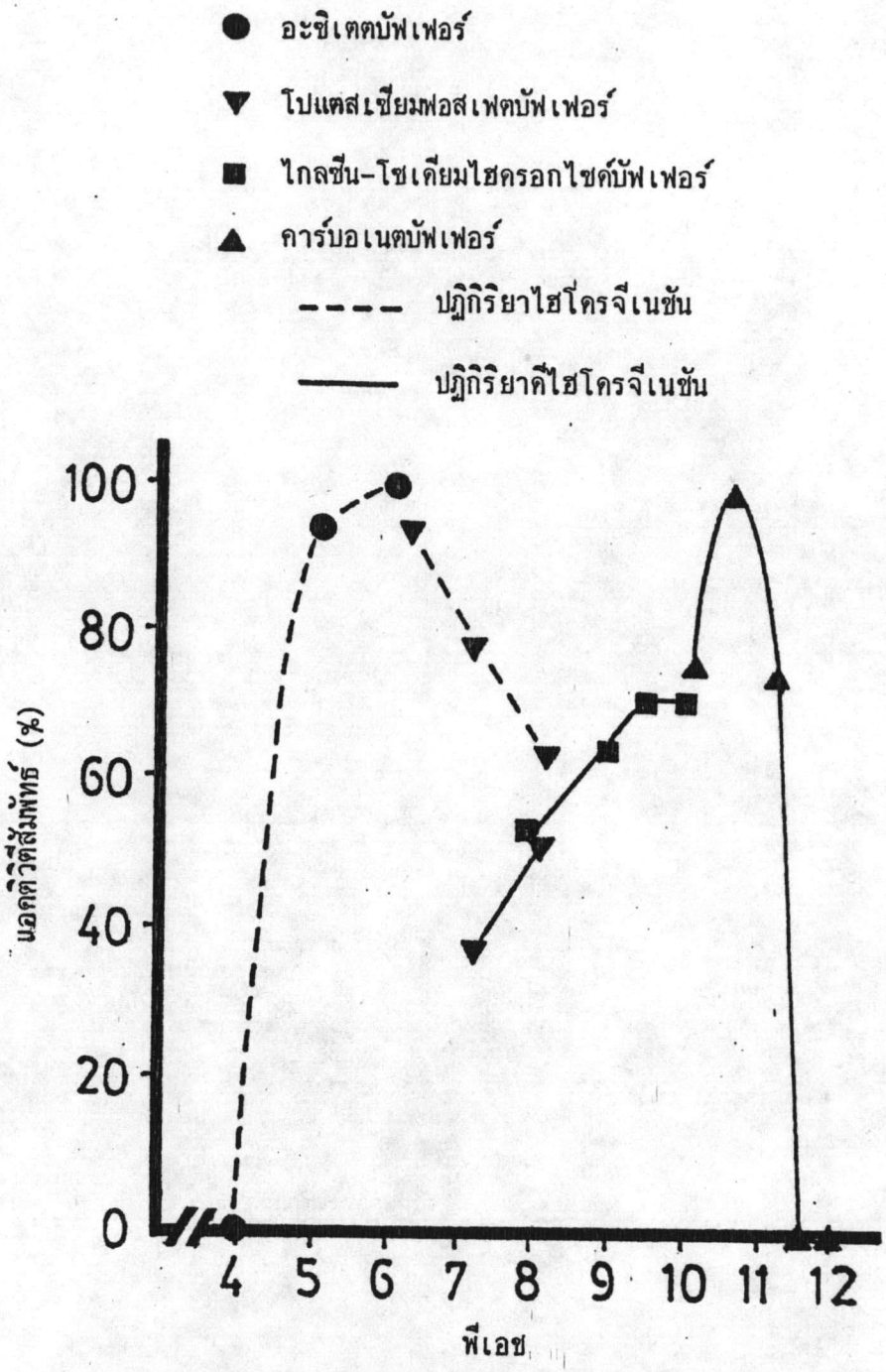
ทำการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์โดยปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชันที่มีกรดดีไฮโดรโคลิกเป็นสับสเตรต (วิธีข้อ 3.6.2) ในช่วงพีเอช 4-6 (อะซิเตตบัฟเฟอร์), พีเอช 6-8 (โปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์) และพีเอช 8-10 (ไกลซีน-โซเดียมไฮดรอกไซด์บัฟเฟอร์) และทำการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์โดยปฏิกิริยาดีไฮโดรจีเนชันที่มีกรดคีออกซีโคลิกเป็นสับสเตรต (วิธีข้อ 3.6.1) ในช่วงพีเอช 6-8 (โปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์), พีเอช 8-10 (ไกลซีน-โซเดียมไฮดรอกไซด์บัฟเฟอร์) และพีเอช 10-12 (คาร์บอเนตบัฟเฟอร์)

ผลการทดลอง (รูปที่ 24) แสดงให้เห็นว่าพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชันของเอนไซม์ 12α-HSDH เมื่อใช้กรดดีไฮโดรโคลิกเป็นสับสเตรตคือ พีเอชประมาณ 5-6 ในขณะที่พีเอช 10.5 จะเหมาะสมกับการเร่งปฏิกิริยาดีไฮโดรจีเนชันเมื่อใช้กรดคีออกซีโคลิกเป็นสับสเตรต

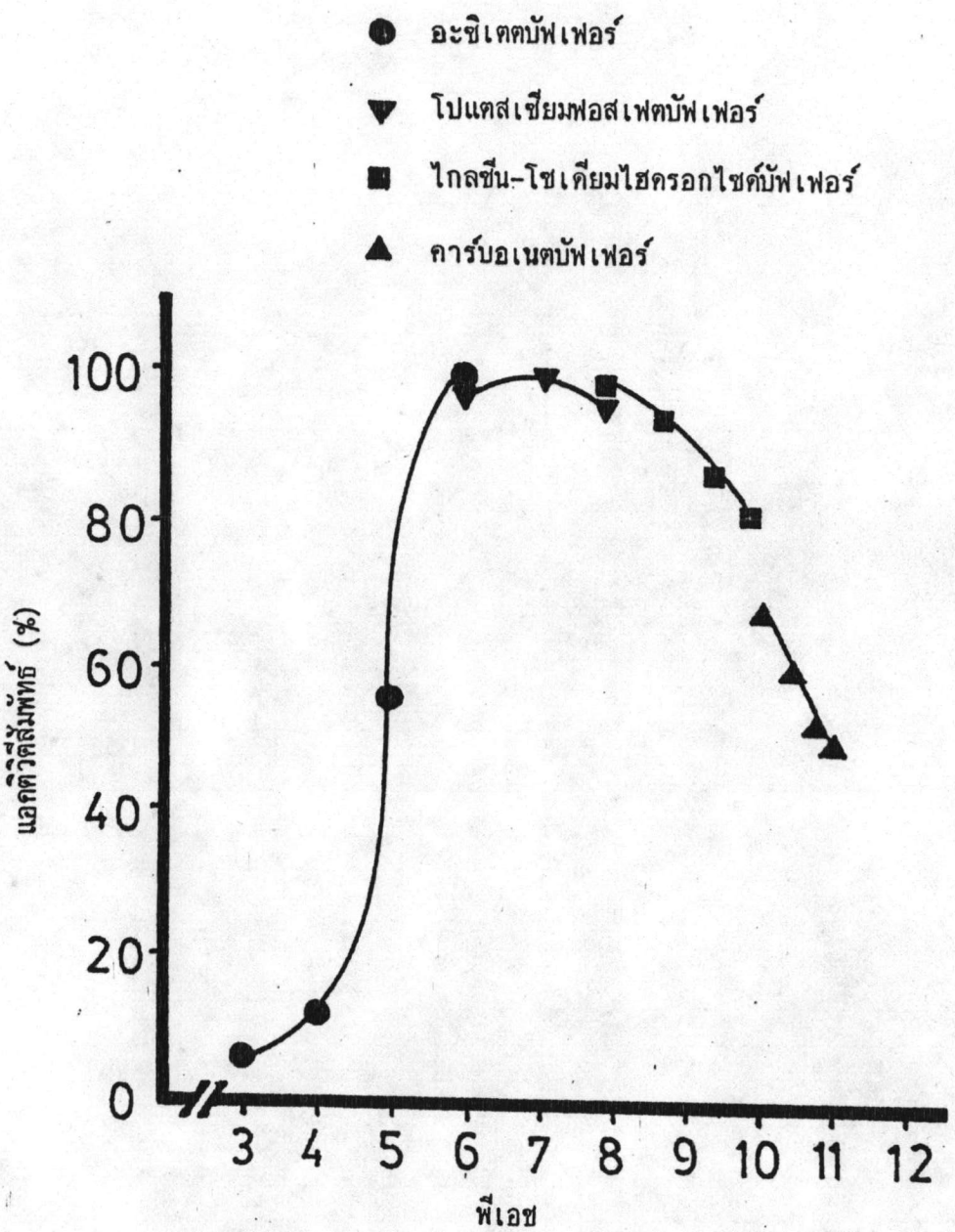
4.9.4 การศึกษาผลของพีเอชต่อความเสถียรของเอนไซม์

บ่มเอนไซม์ในสารละลายบัฟเฟอร์ (เข้มข้น 0.25 โมลาร์ ที่เสริมด้วย 20 เปอร์เซนต์กลีเซอรอล และ 0.1 เปอร์เซนต์ 2-เมอร์แคปโตเอทานอล) พีเอชต่าง ๆ กัน คือ พีเอช 4-6 (อะซิเตตบัฟเฟอร์), พีเอช 6-8 (โปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์), พีเอช 8-10 (ไกลซีน-โซเดียมไฮดรอกไซด์บัฟเฟอร์) และพีเอช 10-12 (คาร์บอเนตบัฟเฟอร์) โดยใช้อัตราส่วนระหว่างเอนไซม์ต่อบัฟเฟอร์เป็น 1 ต่อ 1 โดยปริมาตร (ความเข้มข้นของโปรตีนประมาณ 0.1 มก./มล.) เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 7 °ซ นาน 24 ชั่วโมง แล้วนำมาวัดแอคติวิตีโดยใช้กรดคีออกซีโคลิกเป็นสับสเตรต (วิธีข้อ 3.6.1)

ผลการทดลอง (รูปที่ 25) พบว่าเมื่อบ่มในสภาวะที่ทำการศึกษาเอนไซม์ 12α-HSDH จะมีความเสถียรสูง (มีแอคติวิตีคงเหลือมากกว่า 90 เปอร์เซนต์) ในช่วงพีเอชที่เป็นกลางและพีเอชที่เป็นด่างอ่อน ๆ (พีเอช 6-9) มีความเสถียรปานกลาง (มีแอคติวิตีคงเหลือ 50-70 เปอร์เซนต์) ในช่วงพีเอชที่เป็นด่าง (พีเอช 9-11) และจะมีความเสถียรต่ำ (แอคติวิตีคงเหลือน้อยกว่า 20 เปอร์เซนต์) ในช่วงพีเอชที่เป็นกรด (พีเอชต่ำกว่า 5)



รูปที่ 24 ผลกระทบของพีเอชต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ 12α-HSDH วัดแอคติวิตีโดยปฏิกิริยาดีไฮโดรจีเนชัน (กรดคีออกซีโคลิกเป็นสับสเตรต) ตามวิธีในข้อ 3.6.1 และ โดยปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชัน (กรดดีไฮโดรโคลิกเป็นสับสเตรต) ตามวิธีในข้อ 3.6.2 ที่อุณหภูมิ 30 °ซ ในสารละลายบัฟเฟอร์ (0.25 โมลาร์) พีเอชต่าง ๆ



รูปที่ 25 ผลของพีเอชต่อความเสถียรของเอนไซม์ 12α-HSDH เมื่อบ่มเอนไซม์กับสารละลายบัฟเฟอร์ (0.25 โมลาร์ ที่มี 20 เปอร์เซนต์กลีเซอรอล และ 0.1 เปอร์เซนต์ 2-เมอร์แคปโตเอทานอล) พีเอชต่าง ๆ ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตรที่อุณหภูมิ 7 °ซ นาน 24 ชม. แล้วนำมาวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ โดยปฏิกิริยาดีไฮโดรจีเนชัน (กรดคีออกซีโคลิกเป็นสับสเตรต) (วิธีข้อ 3.6.1)

4.9.5 ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์

วัดแอคติวิตีของเอนไซม์โดยปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชันโดยใช้กรดคีไฮโดรโคลิกเป็นสับสเตรต (วิธีข้อ 3.6.2) ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 20-50 °ซ และวัดแอคติวิตีของเอนไซม์โดยปฏิกิริยาคีไฮโดรจีเนชันเมื่อใช้กรดดีออกซีโคลิกเป็นสับสเตรต (วิธีข้อ 3.6.1) ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 30-70 °ซ

ผลการทดลองในรูปที่ 26 แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ 12α-HSDH สามารถเร่งปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชันได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิประมาณ 25 °ซ ในขณะที่เร่งปฏิกิริยาคีไฮโดรจีเนชันได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิประมาณ 55 °ซ

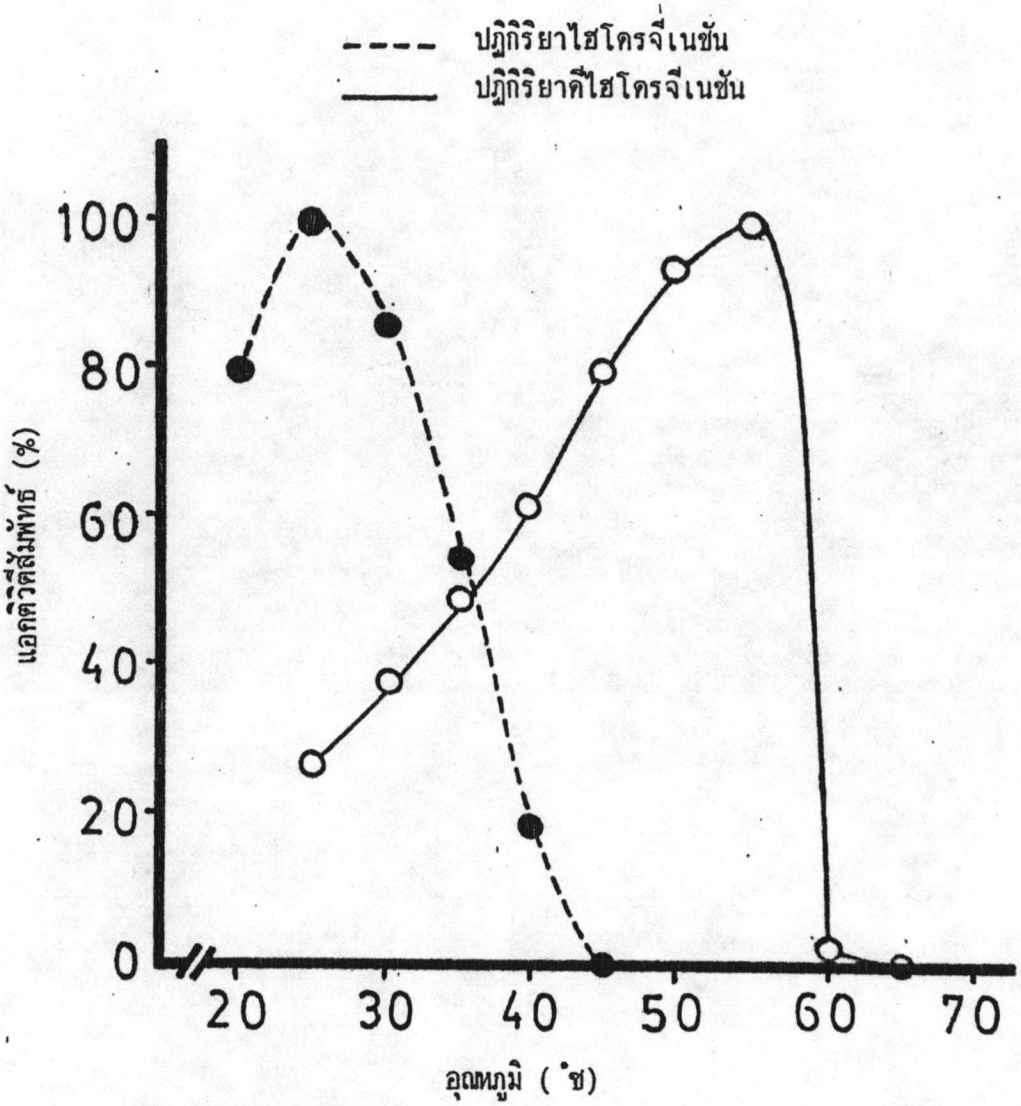
4.9.6 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์

นำเอนไซม์มาบ่มที่อุณหภูมิ 30-50 °ซ เป็นเวลา 10, 20, 30, 40 และ 50 นาที แล้ววัดแอคติวิตีโดยใช้กรดดีออกซีโคลิกเป็นสับสเตรต

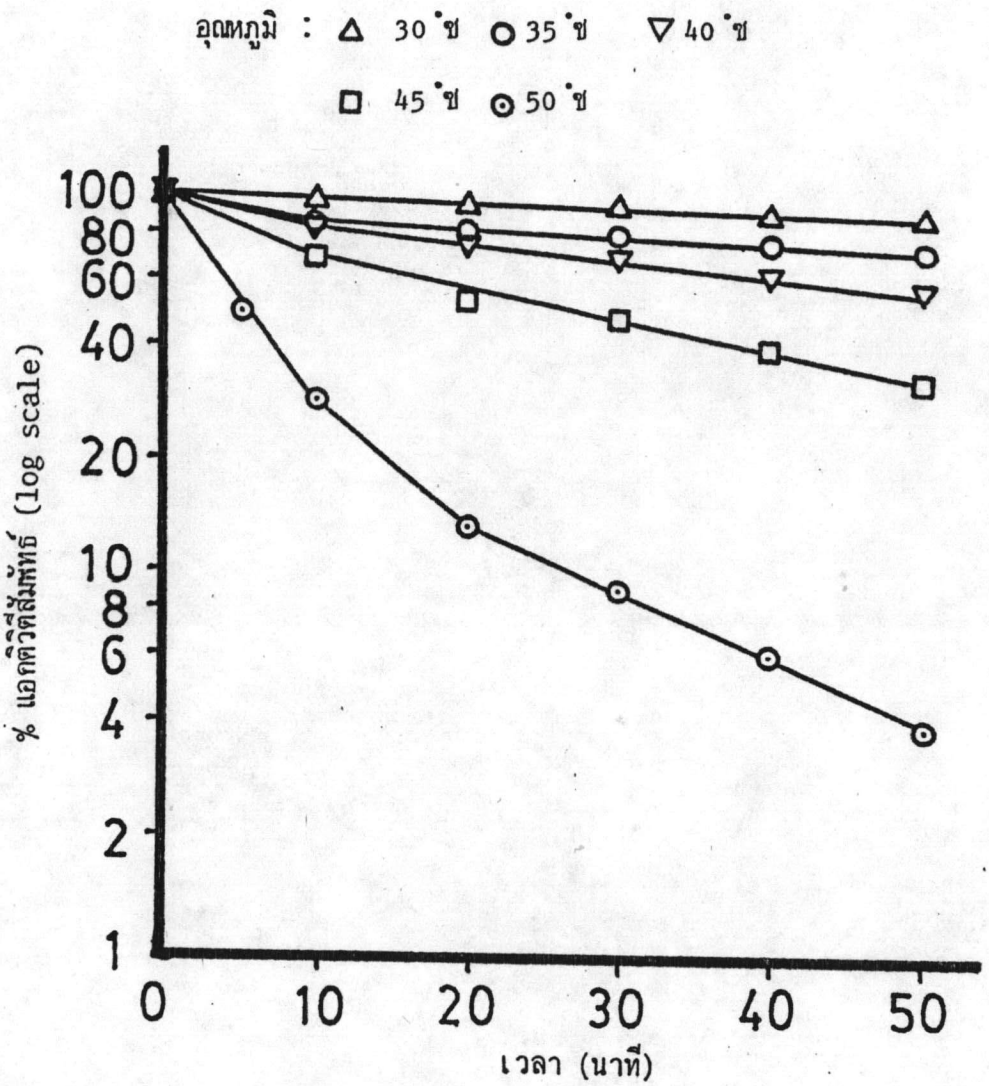
ผลการทดลอง (รูปที่ 27) พบว่าภายในช่วงระยะเวลา 50 นาที ของการอินคิวเบตเอนไซม์ 12α-HSDH จะสูญเสียแอคติวิตีเพียงเล็กน้อยที่อุณหภูมิต่ำกว่า 35 °ซ และจะเริ่มสูญเสียแอคติวิตีอย่างเห็นได้ชัดที่อุณหภูมิมากกว่า 40 °ซ โดยค่า $t_{\frac{1}{2}}$ ของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 30, 35, 40, 45 และ 50 °ซ มีค่าประมาณ 5.83, 2.31, 0.96, 0.46 และ 0.09 ชั่วโมง ตามลำดับ (ค่า $t_{\frac{1}{2}}$ คือเวลาที่ใช้ในการทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์ลดลงไปครึ่งหนึ่งของแอคติวิตีเริ่มต้น สามารถคำนวณได้จากสมการ $K = \frac{0.693}{t_{\frac{1}{2}}}$ ค่า K คำนวณได้จาก slope ของกราฟแต่ละเส้นจากรูปที่ 27 โดย $\text{slope} = \frac{-K}{2.3}$)

4.9.7 ผลของความเข้มข้นของสับสเตรตต่อแอคติวิตีของเอนไซม์เมื่อกำหนดความเข้มข้นของโคเอนไซม์คงที่

ทำการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 3.6.1 (และ 3.6.2) เมื่อใช้กรดน้ำดีชนิดต่าง ๆ และอนุพันธ์เป็นสับสเตรตโดยใช้ความเข้มข้นของโคเอนไซม์คือ NAD^+ หรือ NADH คงที่และอิ่มตัว หลังจากทำ Lineweaver-Burk plot (รูปที่ 28, 29 และ 30) แล้วได้รวบรวมค่า K_m และ V_{max} ไว้ในตารางที่ 5 จากการเปรียบเทียบค่า K_m จะเห็นว่าในจำนวนกรดน้ำดีอิสระทั้งหลายที่ใช้เป็นสับสเตรต (กรดโคลิก, กรดดีออกซีโคลิก และกรดคีไฮโดรโคลิก) กรดดีออกซีโคลิกและกรดโคลิกจะให้ค่า K_m ใกล้เคียงกันมาก คือ 2.94×10^{-5} โมลาร์ และ 3.33×10^{-5} โมลาร์ ในขณะที่ปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชันเมื่อใช้กรดคีไฮโดรโคลิกเป็น



รูปที่ 26 ผลกระทบของอุณหภูมิต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ 12α-HSDH วัดแอคติวิตีโดยปฏิกิริยาดีไฮโดรจีเนชัน (กรดคีออกซีโคลิกเป็นสับสเตรต) ที่อุณหภูมิ 25-70 °ซ ตามวิธีในข้อ 3.6.1 และโดยปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชัน (กรดดีไฮโดรโคลิกเป็นสับสเตรต) ที่อุณหภูมิ 20-50 °ซ ตามวิธีในข้อ 3.6.2



รูปที่ 27 ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์ 12α-HSDH เมื่อบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ 30-50 °ซ เป็นเวลา 10, 20, 30, 40 และ 50 นาที แล้ววัดแอคติวิตีของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 30 °ซ โดยปฏิกิริยาดีไฮโดรจีเนชัน (กรดคีออกซีโคลิกเป็นสับสเตรต) ตามวิธีในข้อ 3.6.1

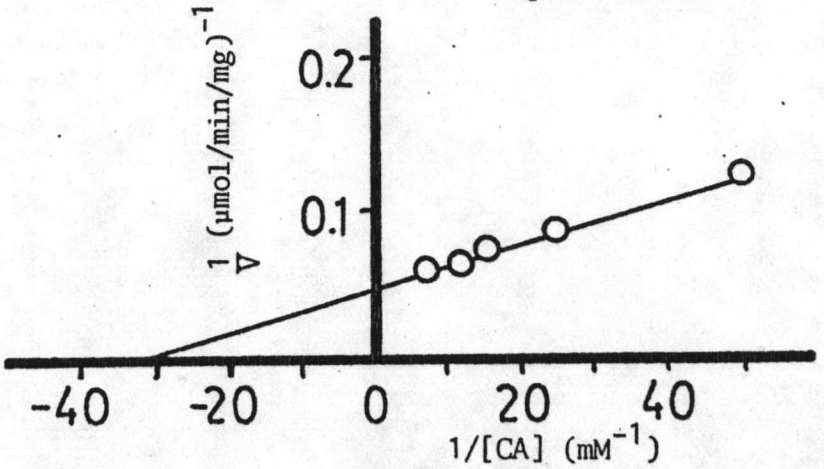
รูปที่ 28 Lineweaver-Burk plot ของเอนไซม์ 12α-HSDH เมื่อใช้กรดน้ำดีชนิดต่าง ๆ เป็นสับสเตรต ทำการวัดแอคติวิตีที่อุณหภูมิ 30 °ซ โดยปฏิกิริยาดีไฮโดรจีเนชัน ตามวิธีข้อ 3.6.1 ซึ่งมี NAD^+ เข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์เป็นโคเอนไซม์ และมีกรดน้ำดีเข้มข้นต่าง ๆ กันเป็นสับสเตรต ได้แก่

(ก) กรดโคลิกเข้มข้น 0.02-0.12 มิลลิโมลาร์

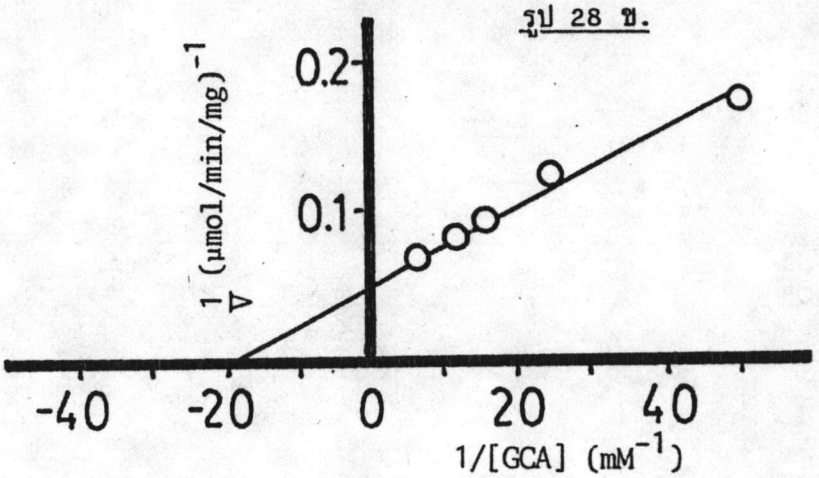
(ข) กรดไกลโคโคลิกเข้มข้น 0.02-0.14 มิลลิโมลาร์

(ค) กรดเทาโรโคลิกเข้มข้น 0.02-0.14 มิลลิโมลาร์

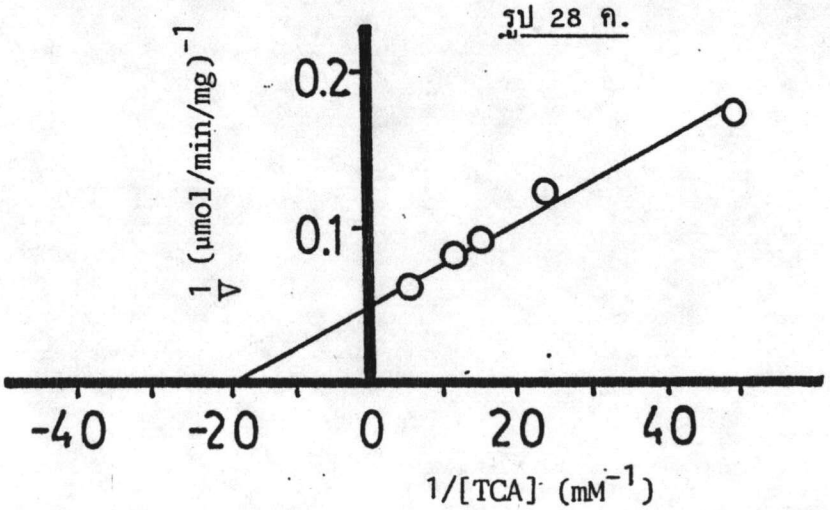
รูป 28 ก.



รูป 28 ข.



รูป 28 ค.



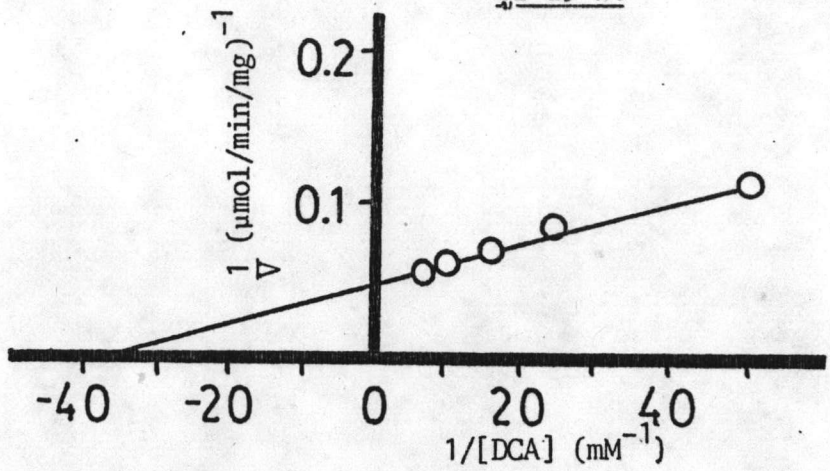
รูปที่ 29 Lineweaver-Burk plot ของเอนไซม์ 12α-HSDH เมื่อใช้กรดน้ำดีชนิดต่าง ๆ เป็นสับสเตรต ทำการวัดแอคติวิตีที่อุณหภูมิ 30 °ซ โดยปฏิกิริยาดีไฮโดรจีเนชันตามวิธีข้อ 3.6.1 ซึ่งมี NAD^+ เข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ เป็นโคเอนไซม์และมีกรดน้ำดีเข้มข้นต่าง ๆ กันเป็นสับสเตรต ได้แก่

(ก) กรดดีออกซีโคลิกเข้มข้น 0.02-0.14 มิลลิโมลาร์

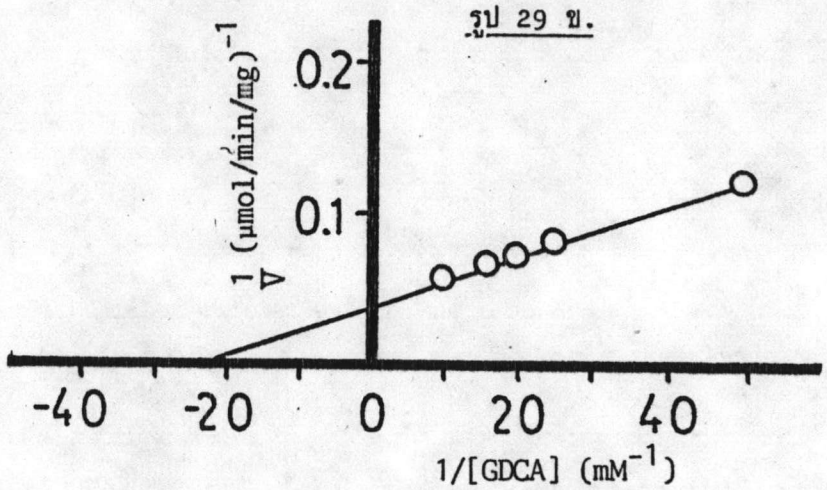
(ข) กรดไกลโคดีออกซีโคลิกเข้มข้น 0.02-0.10 มิลลิโมลาร์

(ค) กรดเทาโรดีออกซีโคลิกเข้มข้น 0.02-0.10 มิลลิโมลาร์

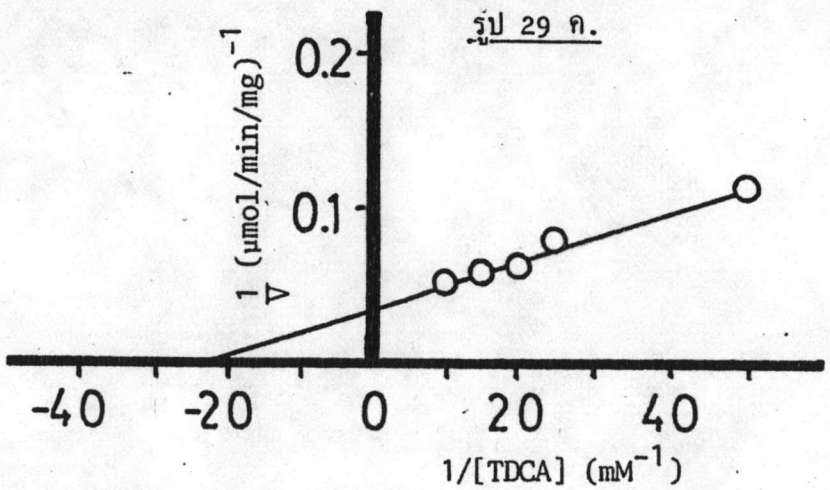
รูป 29 ก.



รูป 29 ข.



รูป 29 ค.



รูปที่ 30 Lineweaver-Burk plot ของเอนไซม์ 12α-HSDH เมื่อใช้

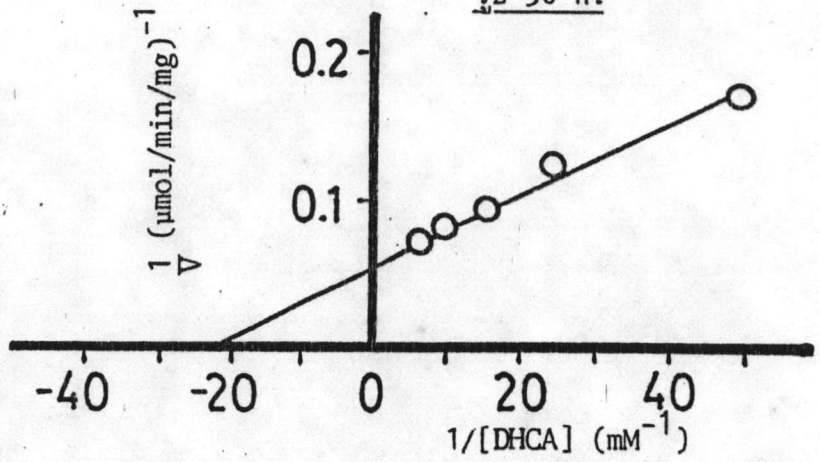
(ก) กรดดีไฮโดรโคลิกเข้มข้นแตกต่างกันตั้งแต่ 0.02-0.14 มิลลิโมลาร์ เป็นสับสเตรต และใช้ NADH เข้มข้น 1.5 มิลลิโมลาร์เป็นโคเอนไซม์

(ข) กรดดีไฮโดรโคลิกเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์เป็นสับสเตรต และแปรผัน NADH, เข้มข้น 0.02-0.20 มิลลิโมลาร์เป็นโคเอนไซม์

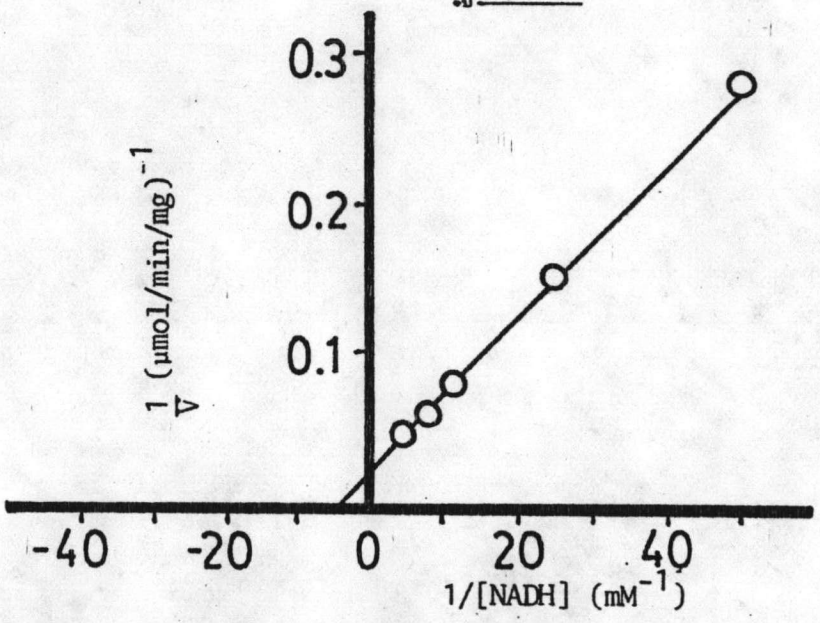
(ค) กรดดีออกซีโคลิกเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์เป็นสับสเตรต และแปรผัน NAD^+, เข้มข้น 0.05-0.50 มิลลิโมลาร์เป็นโคเอนไซม์

วัดแอคติวิตีที่อุณหภูมิ 30 °ซ โดยปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชัน (ข้อ ก และ ข) ตามวิธีในข้อ 3.6.2 และโดยปฏิกิริยาดีไฮโดรจีเนชัน (ข้อ ค) ตามวิธีในข้อ 3.6.1

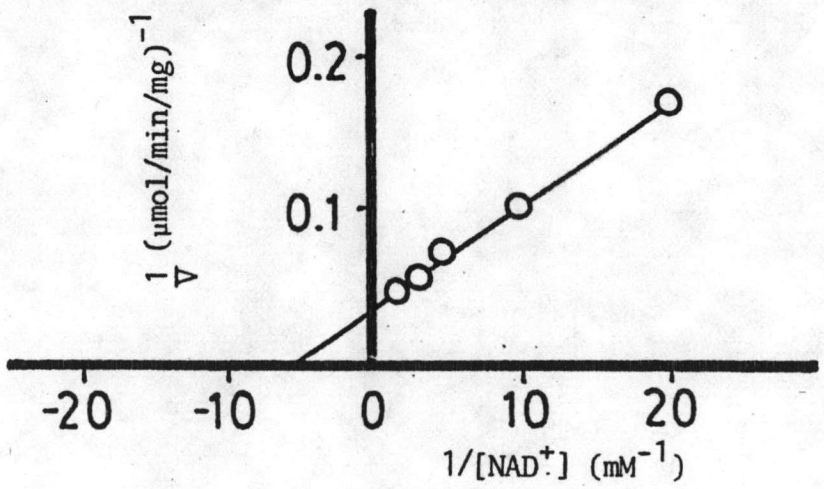
รูป 30 ก.



รูป 30 ข.



รูป 30 ค.



ตารางที่ 5 สรุปค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์ 12α-HSDH เมื่อใช้กรดน้ำดีอิสระชนิดต่าง ๆ และอนุพันธ์เป็นสับสเตรต วัดแอคติวิตีที่อุณหภูมิ 30 °ซ โดยปฏิกิริยาดีไฮโดรจีเนชัน และไฮโดรจีเนชัน เมื่อใช้ปริมาณเอนไซม์เท่ากัน ตามวิธีในข้อ 3.6.1 และ 3.6.2 แล้วหาค่า K_m และ V_{max} โดย Lineweaver-Burk plot (รูปที่ 28, 29 และ 30)

กรดน้ำดี	ค่าคงที่ทางจลน์ศาสตร์	
	K_m	V_{max}
กรดโคลิก	3.33×10^{-5}	0.09
กรดไกลโคโคลิก	5.56×10^{-5}	0.09
กรดเทาโรโคลิก	5.56×10^{-5}	0.09
กรดดีออกซีโคลิก	2.94×10^{-5}	0.09
กรดไกลโคดีออกซีโคลิก	4.76×10^{-5}	0.07
กรดเทาโรดีออกซีโคลิก	4.76×10^{-5}	0.07
กรดดีไฮโดรโคลิก*	4.76×10^{-5}	0.10
NAD^+	2.50×10^{-4}	0.04
NADH*	2.00×10^{-4}	0.07

*วัดแอคติวิตีโดยปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชัน

ค่า K_m มีหน่วยเป็น โมลาร์ (M)

ค่า V_{max} มีหน่วยเป็น ไมโครโมลของ NADH ที่เกิดขึ้น (สำหรับปฏิกิริยาดีไฮโดรจีเนชัน) หรือลดลง (สำหรับปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชัน) ต่อนาที ต่อมิลลิกรัมโปรตีน

สับสเตรตมีค่า K_m ไม่แตกต่างกันมากนัก (4.76×10^{-5} โมลาร์) ผลการใช้อนุพันธ์เทารีนและไกลซีนของกรดโคลิกและกรดดีออกซีโคลิกเป็นสับสเตรตพบว่า ความแตกต่างระหว่างค่า K_m ของอนุพันธ์ทั้ง 2 ชนิดมีค่าน้อยมากภายในกรดน้ำดีชนิดเดียวกัน ไม่ว่าจะเป็นอนุพันธ์ของกรดโคลิกหรืออนุพันธ์ของกรดดีออกซีโคลิก แต่อนุพันธ์เหล่านี้จะมีค่า K_m สูงกว่าค่า K_m ของสับสเตรตที่เป็นกรดน้ำดีอิสระของตัวเองที่ความเข้มข้นของโคเอนไซม์คงที่เท่ากัน (กรดเทาโร-และกรดไกลโคโคลิกมีค่า K_m สูงกว่ากรดโคลิก และในทำนองเดียวกันกรดเทาโร-และกรดไกลโคดีออกซีโคลิกก็มีค่า K_m สูงกว่ากรดดีออกซีโคลิก)

เมื่อทำการทดลองเช่นเดียวกันแต่แปรเปลี่ยนความเข้มข้นของโคเอนไซม์ (NAD^+ หรือ NADH) ที่ความเข้มข้นของสับสเตรต (กรดดีออกซีโคลิกหรือกรดดีไฮโดรโคลิก) คงที่และอิ่มตัว หลังจากทำ Lineweaver-Burk plot (รูปที่ 30) พบว่า K_m ของ NAD^+ และ NADH มีค่าใกล้เคียงกันคือ 2.5×10^{-4} และ 2.0×10^{-4} โมลาร์ ตามลำดับ

4.9.8 <u>การศึกษาผลของความเข้มข้นของสับสเตรตต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันของโคเอนไซม์</u>

การศึกษาในข้อ 4.9.7 เป็นการศึกษาผลความเข้มข้นของสับสเตรตต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ความเข้มข้นของโคเอนไซม์คงที่ ซึ่งการศึกษาแบบนี้อาศัยจลน์ศาสตร์แบบ single-substrate enzyme catalysed reaction อันถือเสมือนว่ากรดน้ำดีเป็นเพียงสับสเตรตชนิดเดียวของเอนไซม์ ดังนั้นถ้ากำหนดให้โคเอนไซม์เป็นสับสเตรตอีกชนิดหนึ่งของเอนไซม์นอกเหนือจากกรดน้ำดี การเร่งปฏิกิริยาในกรณีนี้จะเป็นแบบ two-substrate enzyme catalysed reaction และมีสมการของจลน์ศาสตร์ดังนี้ (Dalziel, 1975)

$$V = \frac{V_m CS}{CS + K_a S + K_b C + K_{ia}.K_b} \qquad \text{---------- (1)}$$

เมื่อ v คือ อัตราเร็วของปฏิกิริยา

V_m คือ อัตราเร็วสูงสุดของปฏิกิริยา

S คือ ความเข้มข้นของสับสเตรต (ในที่นี้คือกรดน้ำดี)

C คือ ความเข้มข้นของโคเอนไซม์ (ในที่นี้คือ NAD^+หรือ NADH)

K_a คือ Michaelis-Menten constant ของโคเอนไซม์

K_b คือ Michaelis-Menten constant ของสับสเตรต

K_{ia} คือ Dissociation constant ของเอนไซม์-โคเอนไซม์ คอมเพล็กซ์

จากสมการ (1) สามารถจัดรูปใหม่ได้เป็น

$$\frac{1}{V} = \frac{K_b}{V_M}\left(1 + \frac{K_{ia}}{C}\right)\frac{1}{S} + \frac{1}{V_m}\left(1 + \frac{K_a}{C}\right) \quad \text{---------- (2)}$$

เมื่อวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ 12α-HSDH ตามวิธีในข้อ 3.6.1 โดยแปรค่าความเข้มข้นของสับสเตรตที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันของโคเอนไซม์ แล้วใช้สมการ (2) ทำการพลอตระหว่างส่วนกลับของอัตราเร็วของปฏิกิริยา ($\frac{1}{V}$) กับส่วนกลับของความเข้มข้นของสับสเตรตกรดน้ำดี ($\frac{1}{S}$) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันของโคเอนไซม์ (NAD^+ หรือ NADH) จะให้ความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงแสดงดังรูปที่ 31 เมื่อนำค่าความชัน (slope) และจุดตัดบนแกน y จากการพลอตครั้งแรก (primary plot) มาพลอตกับความเข้มข้นของโคเอนไซม์ (NAD^+ หรือ NADH) จะสามารถหาค่า K_a, K_b, K_{ia} และ V_{max} ได้ (Dalziel, 1975) ดังรูปที่ 32, 33 และ 34 และค่าเหล่านี้ได้รวบรวมไว้ในตารางที่ 6 ซึ่งจะเห็นได้ว่าค่าคงที่ทางจลน์ศาสตร์ที่แท้จริงเหล่านี้จะมีค่าแตกต่างไปจากที่หาได้โดยใช้จลน์ศาสตร์แบบ single-substrate enzyme catalysed reaction (ข้อ 4.9.7) ซึ่งเป็นค่าที่ได้จากการอนุมาน นอกจากนี้ผลจากการพลอต (primary plot) ยังแสดงให้เห็นว่ากลไก (mechanism) ของการทำปฏิกิริยาระหว่างสับสเตรต (กรดน้ำดี), โคเอนไซม์ (NAD^+ หรือ NADH) กับเอนไซม์นั้นไม่ได้เป็นแบบ ping-pong แต่อาจเป็นแบบ ordered หรือ random ก็ได้

4.9.9 การศึกษาผลการยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์โดยกรดน้ำดีและอนุพันธ์

วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 3.6.1 โดยแปรเปลี่ยนความเข้มข้นของสับสเตรต (กรดคีออกซีโคลิก) เมื่อมีความเข้มข้นของตัวยับยั้งคงที่หลาย ๆ ค่า แล้วนำผลที่ได้ไปทำ Lineweaver-Burk plot รูปที่ 35 และ 36 แสดงให้เห็นว่าการยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์โดยกรดคีโนดีออกซีโคลิกและอนุพันธ์, กรดลิโทโคลิก และกรดอูโซดีออกซีโคลิกเป็นแบบ competitive inhibition เมื่อพิจารณาค่า K_i (ตารางที่ 7) ก็จะเห็นว่ากรดคีโนดีออกซีโคลิกและกรดอูโซดีออกซีโคลิกมีค่า K_i เท่ากันประมาณ 1.0×10^{-3} โมลาร์ ซึ่งค่าที่ได้จะใกล้เคียงกับเมื่อใช้กรดลิโทโคลิกเป็นสารยับยั้ง (1.5×10^{-3} โมลาร์) สำหรับอนุพันธ์เทารีนและไกลซีนของกรดคีโนดีออกซีโคลิกนั้นจะให้ค่า K_i สูงกว่ากรดคีโนดีออกซีโคลิกถึง 4 เท่า

รูปที่ 31 primary plot ของเอนไซม์ 12α-HSDH ที่ได้จากการวัดแอคติวิตีโดย

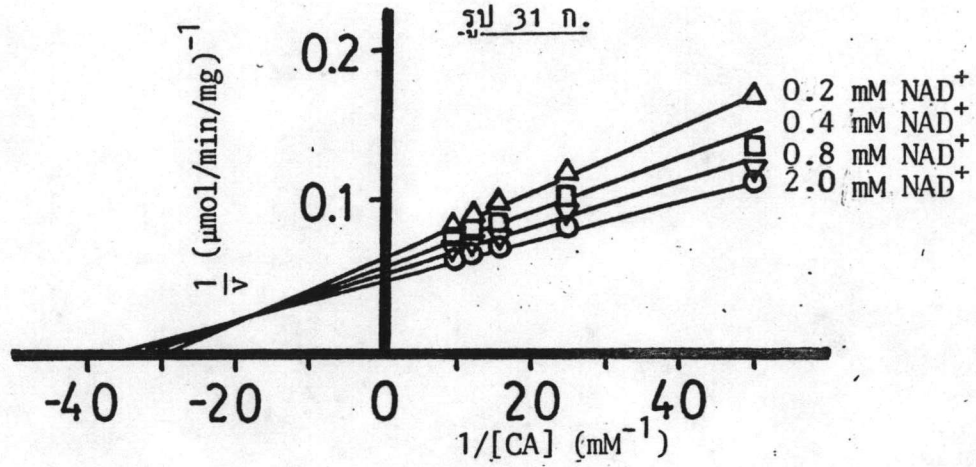
(ก) แปรเปลี่ยนความเข้มข้นของกรดดีออกซีโคลิก 0.02-0.10 มิลลิโมลาร์ ที่ความเข้มข้นของ NAD^+ 0.2-2.0 มิลลิโมลาร์

(ข) แปรเปลี่ยนความเข้มข้นของกรดโคลิก 0.02-0.12 มิลลิโมลาร์ ที่ความเข้มข้นของ NAD^+ 0.2-2.0 มิลลิโมลาร์

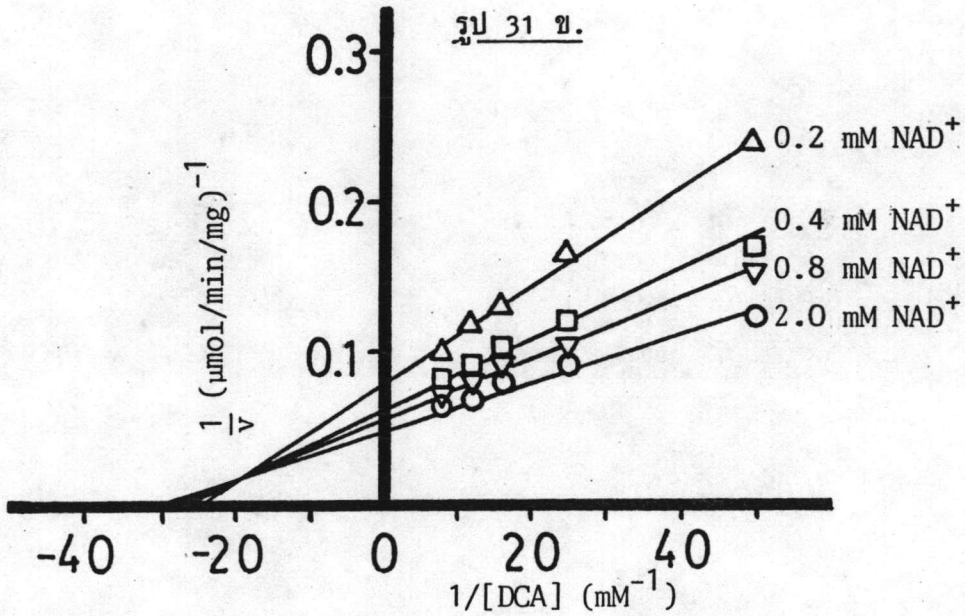
(ค) แปรเปลี่ยนความเข้มข้นของกรดดีไฮโดรโคลิก 0.02-0.14 มิลลิโมลาร์ ที่ความเข้มข้นของ NADH 0.04-0.10 มิลลิโมลาร์

วัดแอคติวิตีที่อุณหภูมิ 30 °ซ โดยปฏิกิริยาดีไฮโดรจีเนชัน (ข้อ ก และ ข) ตามวิธีข้อ 3.6.1 และโดยปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชัน (ข้อ ค) ตามวิธีในข้อ 3.6.2

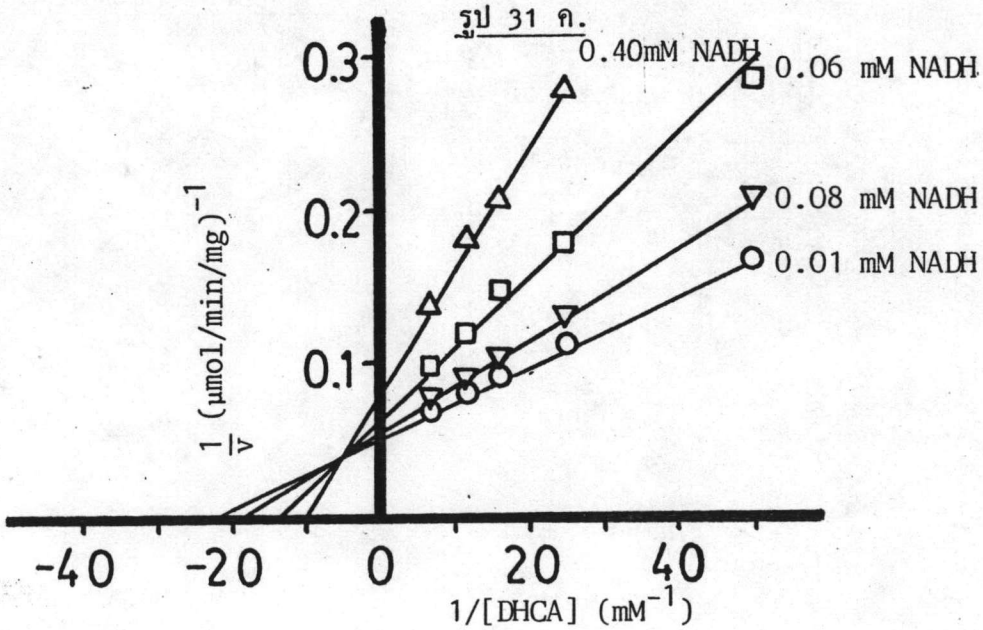
รูป 31 ก.

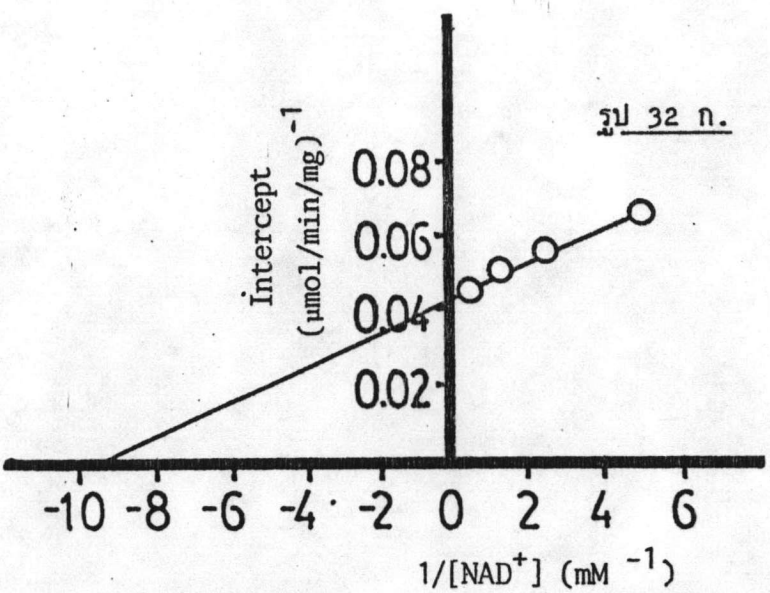


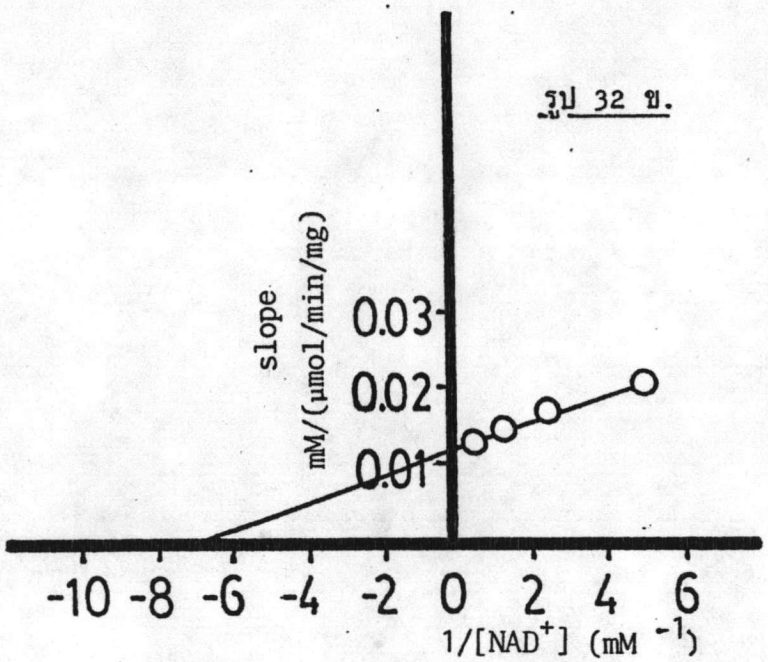
รูป 31 ข.



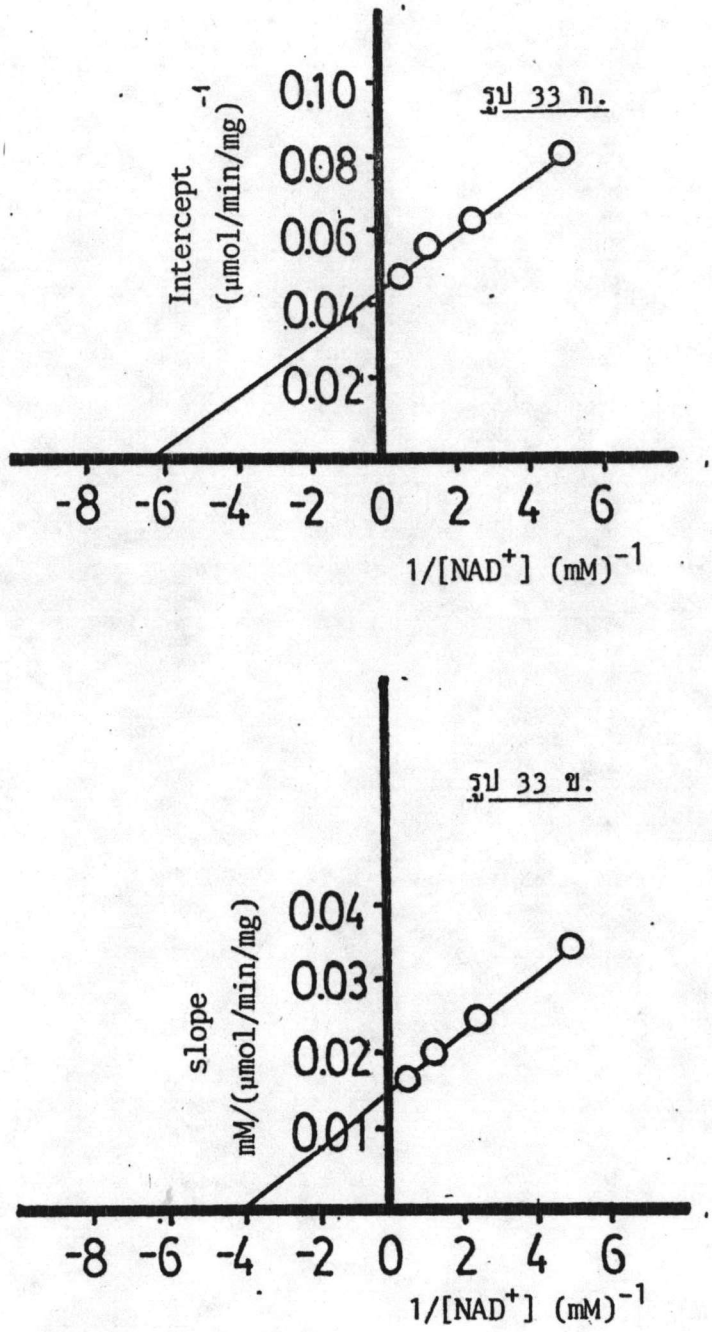
รูป 31 ค.



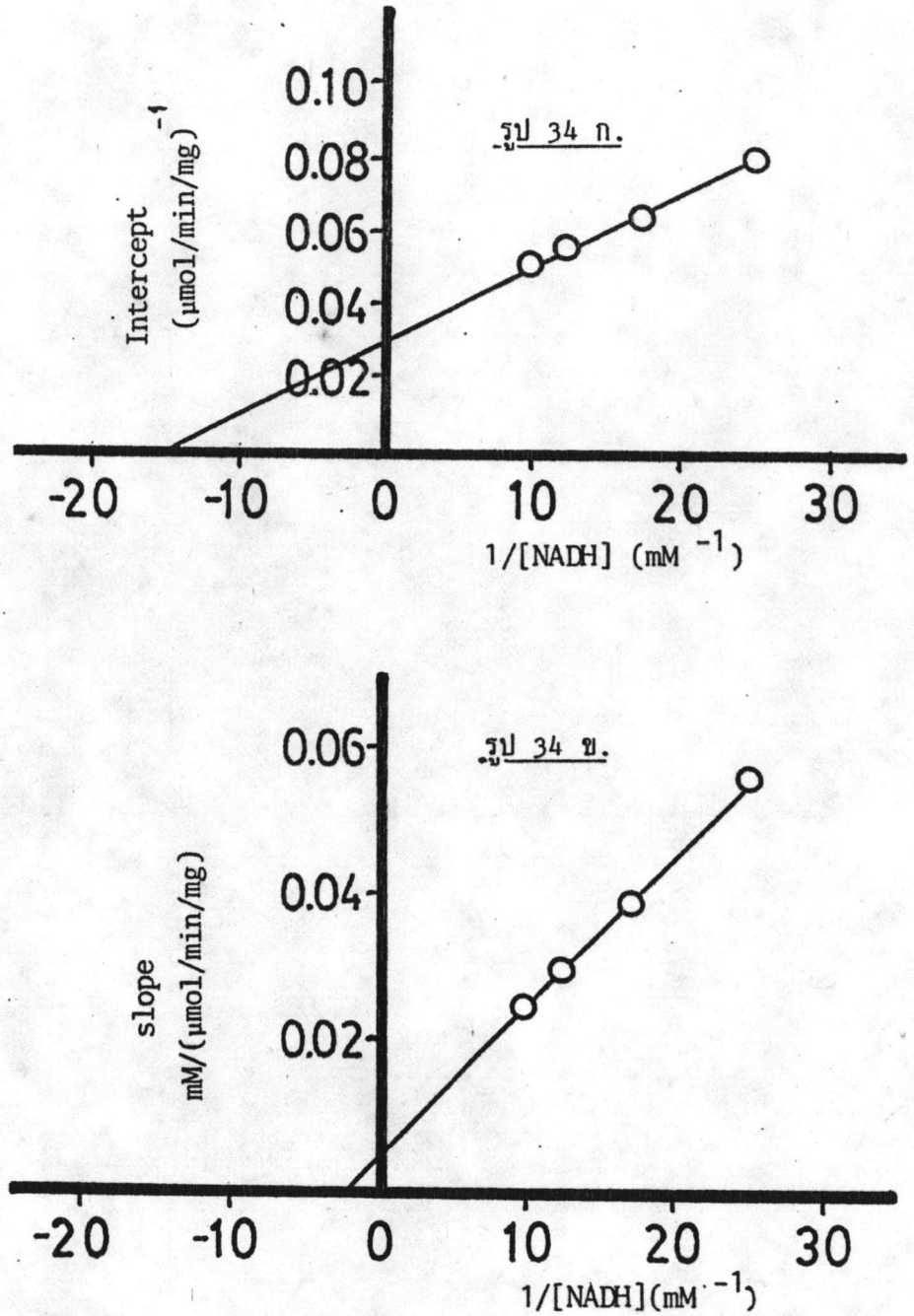




รูปที่ 32 secondary plot ระหว่างส่วนกลับของความเข้มข้นของ NAD^+ กับจุดตัดแกน y (รูป ก.) และ slope (รูป ข.) ที่ได้จาก primary plot (รูปที่ 31 ก) (วัดแอคติวิตีของเอนไซม์โดยการแปรเปลี่ยนความเข้มข้นของกรดคีออกซีโคลิกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ของ NAD^+)



รูปที่ 33 secondary plot ระหว่างส่วนกลับของความเข้มข้นของ NAD^+ กับจุดตัดแกน y (รูป ก.) และ slope (รูป ข.) ที่ได้จาก primary plot รูปที่ 31 (ข.) (วัดแอคติวิตีของเอนไซม์โดยการแปรเปลี่ยนความเข้มข้นของกรดโคลิกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันของ NAD^+)



รูปที่ 34 secondary plot ระหว่างส่วนกลับของความเข้มข้นของ NADH กับจุดตัดแกน y (รูป ก.) และ slope (รูป ข.) ที่ได้จาก primary plot รูปที่ 31 (ค.) (วัดแอคติวิตีของเอนไซม์โดยการแปรเปลี่ยนความเข้มข้นของกรดคีไฮโดรโคลิกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันของ NADH)

ตารางที่ 6 สรุปค่าคงที่ทางจลน์ศาสตร์ของเอนไซม์ 12α-HSDH ที่หาได้จากการทำ secondary plot (รูปที่ 32-34) เมื่อวัดแอคติวิตีของสับสเตรตกรดน้ำดีที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ของโคเอนไซม์ ตามวิธีในข้อ 3.6.1 (ปฏิกิริยาดีไฮโดรจีเนชัน) หรือ 3.6.2 (ปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชัน)

กรดน้ำดี	โคเอนไซม์	ค่าคงที่ทางจลน์ศาสตร์			
		K_a	K_b	K_{ia}	V_{max}
กรดโคลิก	NAD^+	1.61×10^{-4}	3.40×10^{-4}	2.56×10^{-4}	22.72
กรดดีออกซีโคลิก	NAD^+	1.06×10^{-4}	2.79×10^{-4}	1.43×10^{-4}	23.25
กรดดีไฮโดรโคลิก	NADH	7.04×10^{-5}	1.20×10^{-4}	5.88×10^{-4}	34.48

K_a คือ Michaelis-Menten constant ของ NAD^+ หรือ NADH

K_b คือ Michaelis-Menten constant ของกรดน้ำดี

K_{ia} คือ Dissociation constant ของ enzyme-coenzyme complex

K_a, K_b และ K_{ia} มีหน่วยเป็นโมลาร์ (M)

V_{max} มีหน่วยเป็นไมโครโมล/นาที/มิลลิกรัมโปรตีน

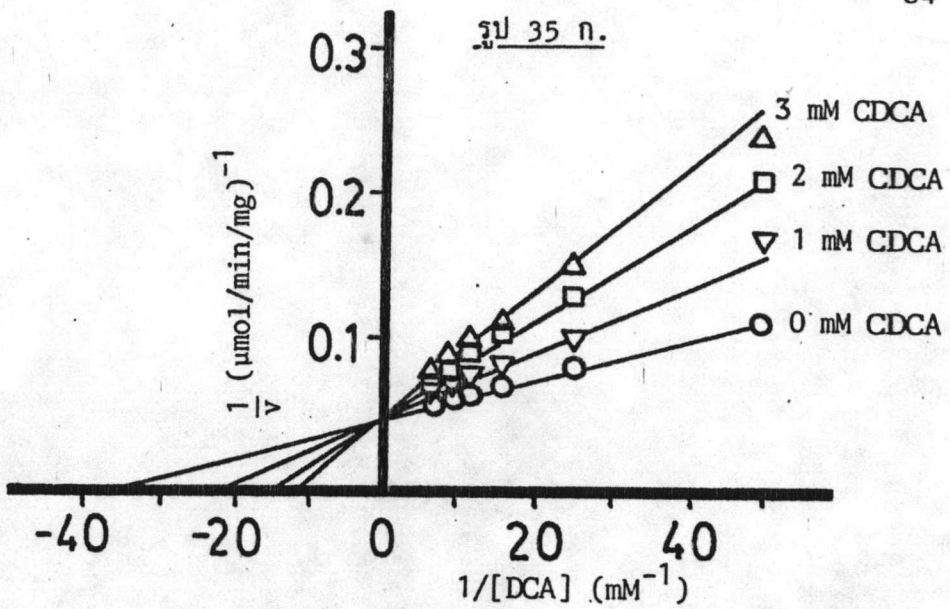
รูปที่ 35 Reciprocal plot ของเอนไซม์ 12α-HSDH เมื่อถูกยับยั้งโดยกรดน้ำดีชนิดต่าง ๆ ทำการวัดแอคติวิตีที่อุณหภูมิ 30 °ซ โดยปฏิกิริยาดีไฮโดรจีเนชันตามวิธีข้อ 3.6.1 ซึ่งมีกรดดีออกซีโคลิกเข้มข้น 0.02-0.14 มิลลิโมลาร์เป็นสับสเตรต, มี NAD เข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์เป็นโคเอนไซม์ และมีกรดน้ำดีเข้มข้นต่าง ๆ กันเป็นตัวยับยั้ง ได้แก่

(ก) กรดคีโนดีออกซีโคลิกเข้มข้น 1-3 มิลลิโมลาร์

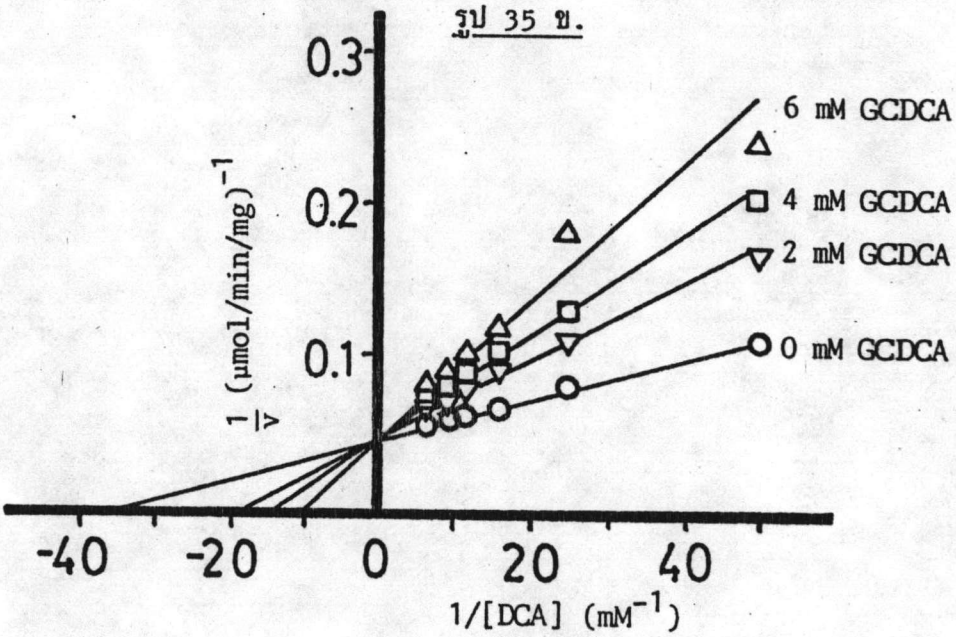
(ข) กรดไกลโคคีโนดีออกซีโคลิกเข้มข้น 2-6 มิลลิโมลาร์

(ค) กรดเทาโรคีโนดีออกซีโคลิกเข้มข้น 2-6 มิลลิโมลาร์

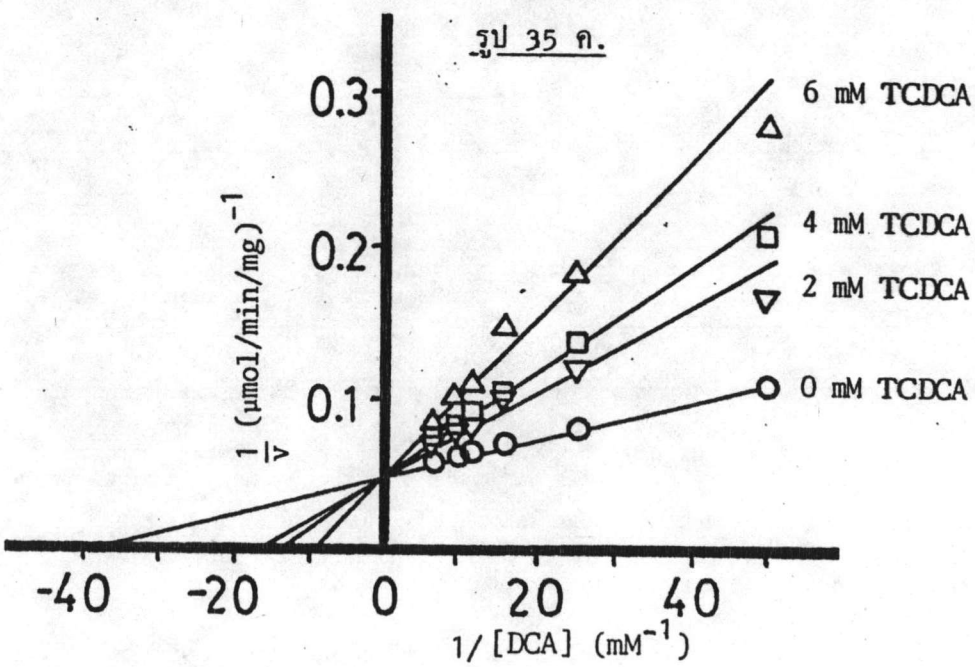
รูป 35 ก.



รูป 35 ข.



รูป 35 ค.

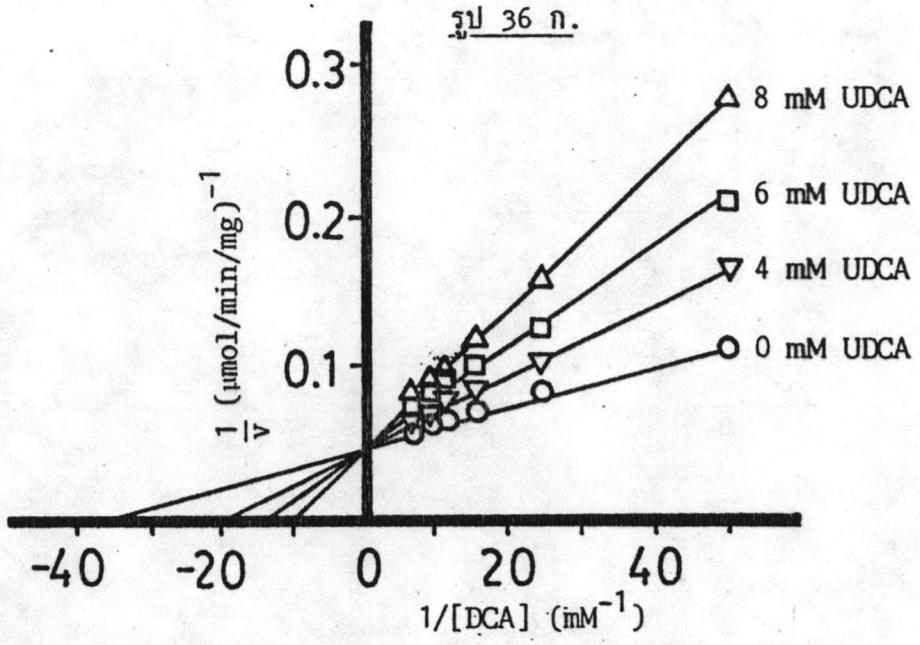


รูปที่ 36 Reciprocal plot ของเอนไซม์ 12α-HSDH เมื่อถูกยับยั้งโดยกรดน้ำดีชนิดต่าง ๆ ทำการวัดแอคติวิตีที่ อุณหภูมิ 30 °ซ โดยปฏิกิริยาดีไฮโดรจีเนชัน ตามวิธีข้อ 3.6.1 ซึ่งมีกรดดีออกซีโคลิกเข้มข้น 0.02-0.14 มิลลิโมลาร์ เป็นสับสเตรต, มี NAD^+ เข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ เป็นโคเอนไซม์ และมีกรดน้ำดีเข้มข้นต่าง ๆ กันเป็นตัวยับยั้ง ได้แก่

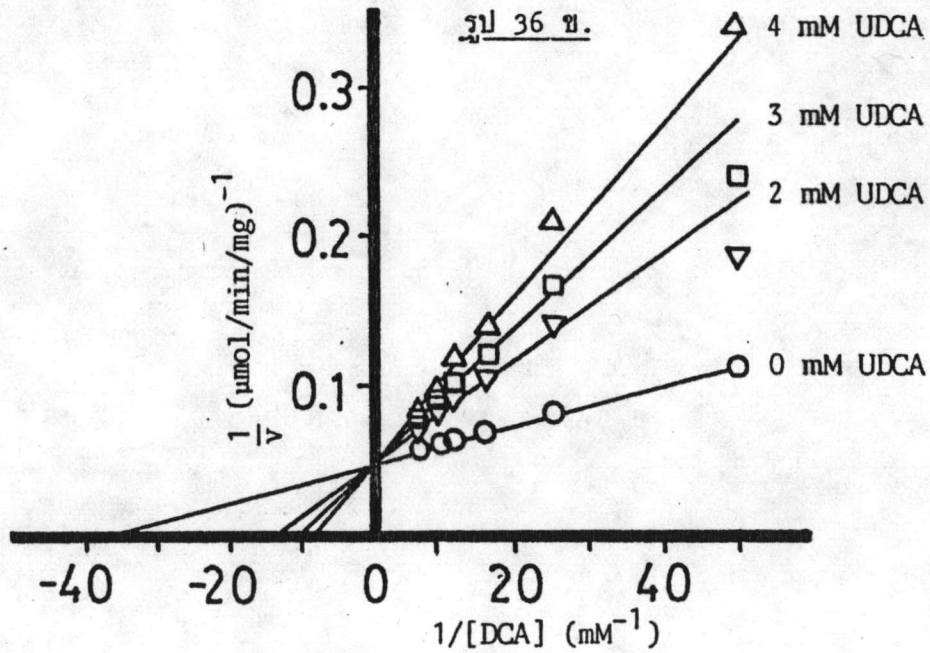
(ก) กรดอูโซดีออกซีโคลิกเข้มข้น 4-8 มิลลิโมลาร์

(ข) กรดลิโทโคลิกเข้มข้น 2-4 มิลลิโมลาร์

รูป 36 ก.


0.3
0.2
0.1
$\frac{1}{v}$ (µmol/min/mg)$^{-1}$
8 mM UDCA
6 mM UDCA
4 mM UDCA
0 mM UDCA
-40
-20
0
20
40
1/[DCA] (mM^{-1})

รูป 36 ข.


0.3
0.2
0.1
$\frac{1}{v}$ (µmol/min/mg)$^{-1}$
4 mM UDCA
3 mM UDCA
2 mM UDCA
0 mM UDCA
-40
-20
0
20
40
1/[DCA] (mM^{-1})

ตารางที่ 7 สรุปค่า K_i ของเอนไซม์ 12α-HSDH เมื่อใช้กรดน้ำดีชนิดต่าง ๆ และอนุพันธ์เป็นตัวยับยั้ง วัดแอคติวิตีที่อุณหภูมิ 30 °ซ โดยปฏิกิริยาดีไฮโดรจีเนชัน (กรดดีออกซี-โคลิกเป็นสับสเตรต) เมื่อใช้ปริมาณเอนไซม์คงที่เท่ากันทุกการทดลอง ตามวิธีในข้อ 3.6.1 ค่า K_i หาได้จากการทำ Lineweaver-Burk plot (รูปที่ 35 และ 36)

กรดน้ำดี	ค่าคงที่ทางจลน์ศาสตร์	
	$^{*}K_i$	$^{**}V_{max}$
กรดดีโนดีออกซีโคลิก	1.0×10^{-3}	0.09
กรดไกลโคดีโนดีออกซีโคลิก	4.0×10^{-3}	0.09
กรดเทาโรดีโนดีออกซีโคลิก	4.0×10^{-3}	0.09
กรดอูโซดีออกซีโคลิก	1.0×10^{-3}	0.09
กรดลิโทโคลิก	1.5×10^{-3}	0.09

$^{*}K_i$ มีหน่วยเป็น โมลาร์ (M)

$^{**}V_{max}$ มีหน่วยเป็น ไมโครโมลของ NADH ที่เกิดขึ้นต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน

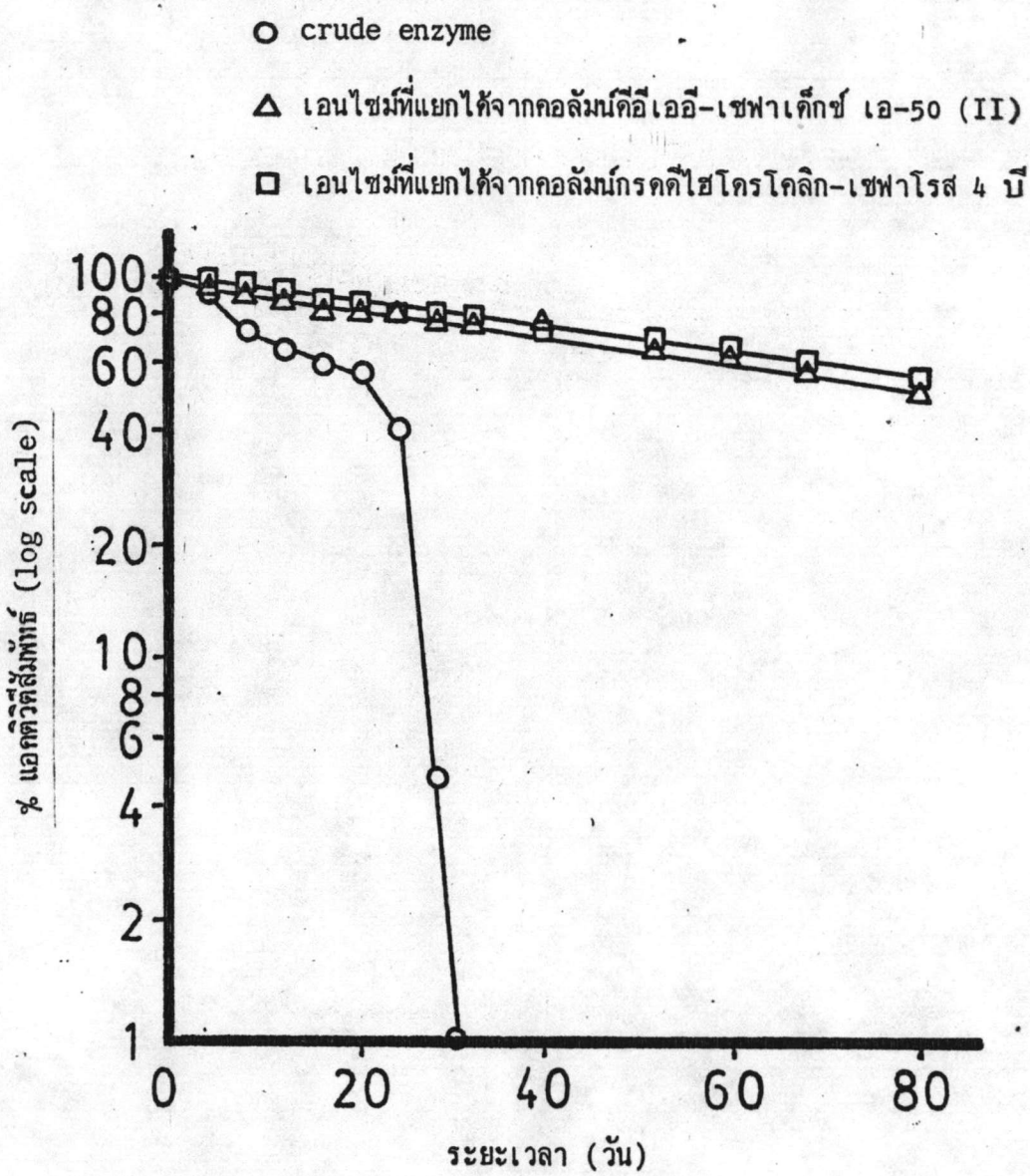
4.9.10 ผลการศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิของการเก็บรักษา

นำสารละลายเอนไซม์ที่สกัดแยกจากเซลล์ B. fuscum ในขั้นตอนแรก, สารละลายที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วบางส่วนที่แยกจากคอลัมน์ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 (II) (ข้อ 4.7.2.2) และเอนไซม์ที่มีความบริสุทธิ์สูง คือที่แยกได้จากคอลัมน์กรดดีไฮโดรโคลิก-เซฟาโรส 4 บี (II) (ข้อ 4.7.3.2) มาเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 7 °ซ แล้วติดตามวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ 12α-HSDH โดยใช้กรดดีออกซีโคลิกเป็นสับสเตรต (วิธีข้อ 3.6.1) เป็นระยะ ๆ นาน 80 วัน

ผลการทดลอง (รูปที่ 37) แสดงให้เห็นว่าสารละลายเอนไซม์ที่ยังไม่ได้ทำให้บริสุทธิ์จะมีการลดลงของแอคติวิตีเร็วกว่าที่ผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ไปบ้างแล้วบางส่วน คือจะมีแอคติวิตีในช่วงแรกค่อย ๆ ลดลงเหลือประมาณ 40 เปอร์เซนต์ ภายในช่วงเวลา 20 วัน และจะสูญเสียแอคติวิตีไปทั้งหมดภายในระยะเวลาเพียง 30 วันของการเก็บรักษา ในขณะที่เอนไซม์ที่ผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ยังคงมีแอคติวิตีเหลืออยู่ถึง 80 เปอร์เซนต์ เมื่อเก็บรักษาไว้ในสภาวะเดียวกันนาน 30 วัน การลดลงของแอคติวิตีจะใกล้เคียงกัน สำหรับเอนไซม์ที่แยกได้จากคอลัมน์ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 และที่แยกได้จากคอลัมน์กรดดีไฮโดรโคลิก-เซฟาโรส 4 บี ทั้งนี้ $t_{\frac{1}{2}}$ ของเอนไซม์หลังขั้นตอนดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 (II) และหลังขั้นตอนกรดดีไฮโดรโคลิก-เซฟาโรส 4 บี (II) มีค่าเท่ากับ 80.6 และ 91.2 วัน ตามลำดับ ในขณะที่เอนไซม์ที่ยังไม่ได้ทำให้บริสุทธิ์มีค่า $t_{\frac{1}{2}}$ เพียง 24.8 วัน

4.10 ผลการศึกษาศักยภาพในการสังเคราะห์กรด 12-คีโตดีโนดีออกซีโคลิกโดยเอนไซม์ 12α-HSDH ที่มีความบริสุทธิ์สูง

นำสารละลายเอนไซม์จากข้อ 4.7.3.2 มาทำปฏิกิริยากับกรดโคลิก (เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์) ในสารละลายปฏิกิริยา ซึ่งมี NAD^+ ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน (0-5 มิลลิโมลาร์) พีเอช 9.5 (วิธีข้อ 3.6.1) ปล่อยให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 30 °ซ แล้วดูดมา 0.5 มิลลิลิตร เติม 1 นอร์มอลกรดไฮโดรคลอริก และ 0.1 มิลลิลิตรของ 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของสารละลายเทสโทสเทอโรน (ใช้เป็นสารมาตรฐานภายในวิธีวัด) (internal standard) แล้วนำมาสกัดด้วยเอทิลอะซิเตต อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 65 °ซ (วิธีข้อ 3.11.1) หลังจากนั้นละลายสารที่ได้ด้วยเมทานอล นำไปวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดน้ำดีโดยวิธี HPLC (วิธีข้อ 3.11.2)



รูปที่ 37 เปรียบเทียบความเสถียรของเอนไซม์ 12α-HSDH ในสภาพ crude enzyme, ที่แยกได้จากคอลัมน์ดีอีเอดี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 (II) และที่แยกได้จากคอลัมน์ กรดดีไฮโดรโคลิก-เซฟาโรส 4 บี (II) เมื่อเก็บรักษาไว้ในสารละลายโปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 6.8) ที่เสริมด้วย 20 เปอร์เซนต์กลีเซอรอล และ 0.1 เปอร์เซนต์ 2-เมอร์แคปโตเอทานอล ที่อุณหภูมิ 7 °ซ นาน 80 วัน และวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เป็นระยะ ๆ โดยปฏิกิริยาดีไฮโดรจีเนชัน (กรดคีออกซีโคลิกเป็นสับสเตรต) ตามวิธีในข้อ 3.6.1

ผลการทดลองซึ่งแสดงไว้ในภาคผนวกที่ 7 แสดงให้เห็นว่ากรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก และเทสโทสเทอโรนบริสุทธิ์มีตำแหน่งในโครมาโตแกรมเมื่อวิเคราะห์โดยวิธี HPLC ต่างกัน และแสดงได้โดยค่าเวลาของการอยู่ในคอลัมน์ HPLC (retention time) 10.18 นาที สำหรับกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก,11.83นาทีสำหรับเทสโทสเทอโรน และ 16.83 นาที สำหรับกรดโคลิกมาตรฐาน

เมื่อทำการวิเคราะห์สารผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับกรดโคลิกที่ความเข้มข้นของโคเอนไซม์ NAD^+ 0-5 มิลลิโมลาร์ ผลการทดลองรูปที่ 38 จะเริ่มสังเกตพบพีค (peak) ซึ่งคาดว่าเป็นของสารผลิตภัณฑ์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก เนื่องจากมีตำแหน่งที่เดียวกันและมีค่าเวลาของการอยู่ในคอลัมน์ใกล้เคียงกันกับของกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกที่บริสุทธิ์ ที่ความเข้มข้นของ NAD^+ ตั้งแต่ 0.5 มิลลิโมลาร์เป็นต้นไป และเมื่อคำนวณหาเปอร์เซนต์ของสารผลิตภัณฑ์กรดน้ำดีต่อสารเทสโทสเทอโรนมาตรฐาน แล้วนำไปเทียบหาปริมาณของกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกจากกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวกที่ 6) จะได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 39 ซึ่งจะเห็นได้ว่าในสภาวะที่ทำการสังเคราะห์จะได้ปริมาณของสารผลิตภัณฑ์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกสูงที่สุด (0.8 มิลลิโมลาร์) ที่ความเข้มข้นของ NAD^+ เท่ากับ 3 มิลลิโมลาร์ หลังจากนี้แล้วการเพิ่มความเข้มข้นของ NAD^+ จะทำให้ปริมาณของกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก มีค่าคงที่และดูเหมือนว่าจะคงที่ที่ความเข้มข้นของ NAD^+ ประมาณ 2 มิลลิโมลาร์

รูปที่ 38 ลักษณะของโครมาโตแกรมของสารผลิตภัณฑ์ ที่ได้จากปฏิกิริยาการเปลี่ยนรูปกรดโคลิกโดยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ 12α-HSDH จาก B. fuscum เมื่อแปรเปลี่ยนความเข้มข้นของโคเอนไซม์ NAD^+ ในสารละลายปฏิกิริยาต่าง ๆ กัน (รายละเอียดของวิธีทดลองระบุไว้ในข้อ 3.11)

รูป ก. ความเข้มข้นของ NAD^+ เท่ากับศูนย์

รูป ข. ความเข้มข้นของ NAD^+ เท่ากับ 0.5 มิลลิโมลาร์

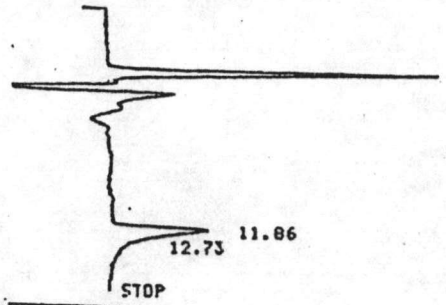
รูป ค. ความเข้มข้นของ NAD^+ เท่ากับ 1.0 มิลลิโมลาร์

รูป ง. ความเข้มข้นของ NAD^+ เท่ากับ 2.0 มิลลิโมลาร์

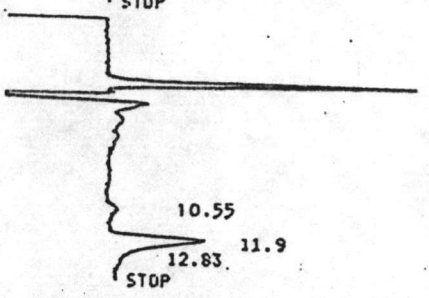
รูป จ. ความเข้มข้นของ NAD^+ เท่ากับ 3.0 มิลลิโมลาร์

รูป ฉ. ความเข้มข้นของ NAD^+ เท่ากับ 4.0 มิลลิโมลาร์

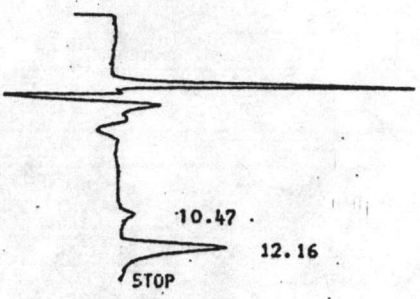
รูป ช. ความเข้มข้นของ NAD^+ เท่ากับ 5.0 มิลลิโมลาร์



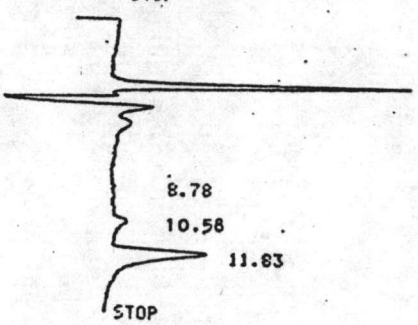
รูป 38 ก.



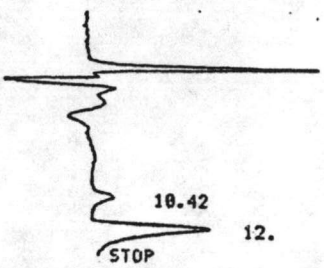
รูป 38 ข.



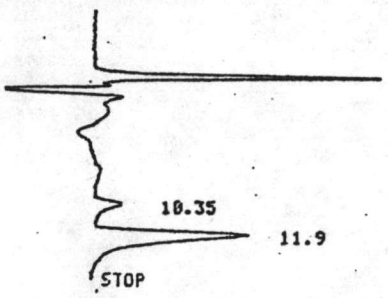
รูป 38 ก.



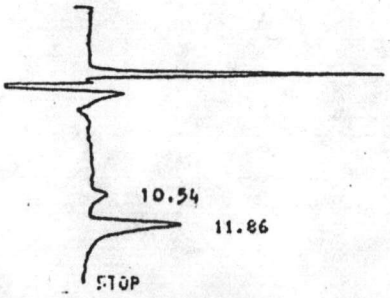
รูป 38 ง.



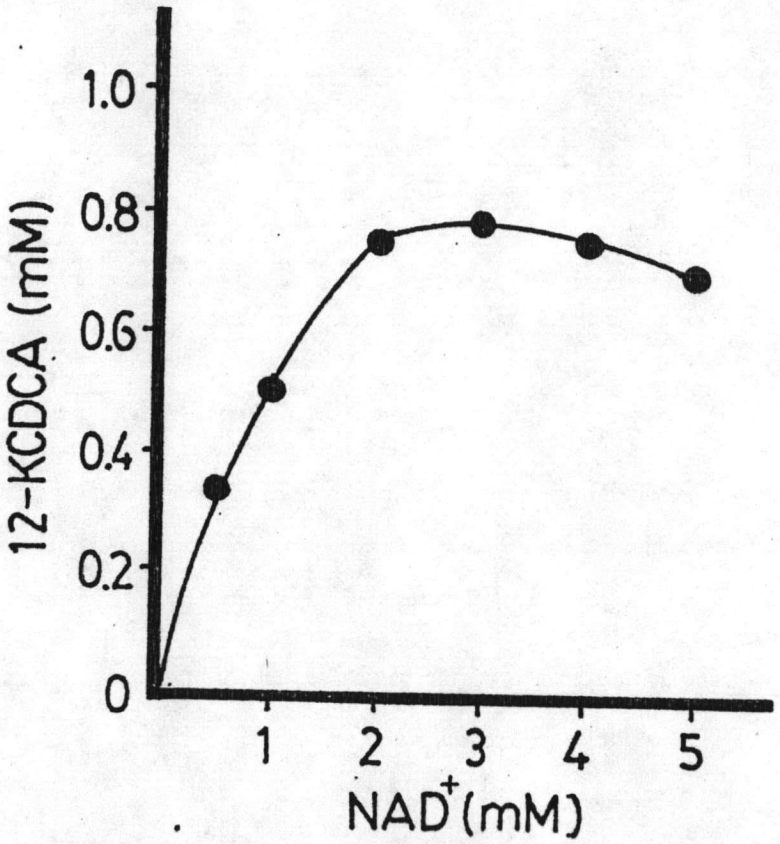
รูป 38 จ.



รูป 38 ฉ.



รูป 38 ช.



รูปที่ 39 การศึกษาผลกระทบของ NAD^+ ต่อการเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก จากกรดโคลิกโดยเอนไซม์ 12 - HSDH (วิธีข้อ 3.11.1) ติดตามวิเคราะห์ปริมาณของกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกที่เกิดขึ้นโดยวิธี HPLC (วิธีข้อ 3.11.2)